

Bacillus 属細菌が持つべん毛モーターの回転機構の解明

著者	?橋 優嘉
学位授与大学	東洋大学
取得学位	博士
学位の分野	生命科学
報告番号	32663甲第372号
学位授与年月日	2014-09-25
URL	http://id.nii.ac.jp/1060/00006742/

2014 年度
東洋大学審査学位論文

Bacillus 属細菌が持つべん毛モーター
の回転機構の解明

生命科学研究科 生命科学専攻博士後期課程
3 学年 学籍番号 4910100002 高橋 優嘉

目次		頁
第一章	序論	
第一節	細菌の運動性とべん毛	3
第二節	べん毛の形態と構造	5
第三節	細菌の運動性における固定子の関与	9
第四節	回転子タンパク質 FliG と固定子タンパク質の相互作用	15
第五節	本論文の章立て	19
第二章	枯草菌べん毛モーターH ⁺ 駆動型固定子 MotAB と Na ⁺ 駆動型固定子 MotPS の回転駆動力の発生に重要なアミノ酸残基の特定と解析	
第一節	緒言	22
第二節	実験材料と方法	24
第一項	実験材料	24
第二項	実験手法	39
第三節	結果	54
第四節	考察	75
第三章	枯草菌べん毛モーター固定子におけるイオン流入経路に関与するアミノ酸残基の特定と解析	
第一節	緒言	78
第二節	実験材料と方法	80
第一項	実験材料	80
第二項	実験手法	87
第三節	結果	89
第四節	考察	98

第四章	枯草菌と好アルカリ性細菌 <i>Bacillus pseudofirmus</i> OF4 の Na ⁺ 駆動型固定子 MotPS の 中性環境における Na ⁺ 親和性の差異の解明	
第一節	緒言	102
第二節	実験材料と方法	104
第一項	実験材料	104
第二項	実験手法	112
第三節	結果	120
第四節	考察	143
第五章	総括	
第一節	枯草菌べん毛モーターH ⁺ 駆動型固定子 MotAB と Na ⁺ 駆動型固定子 MotPS の回転 駆動力の発生に重要なアミノ酸残基の特定と解析について	146
第二節	枯草菌べん毛モーター固定子におけるイオン流入経路に関与するアミノ酸残基の 特定と解析について	150
第三節	枯草菌と好アルカリ性細菌 <i>Bacillus pseudofirmus</i> OF4 の Na ⁺ 駆動型固定子 MotPS の 中性環境における Na ⁺ 親和性の差異の解明について	153
第四節	今後の展望	157
参考文献		159
本研究における成果		166
謝辞		172

第一章 序論

第一節 細菌の運動性とべん毛

1676 年にレーヴェンフックによってアニマクルと呼ばれる細菌が発見された。発見された当初からアニマクルの運動性が報告されていた⁽¹⁾。1970 年代には細菌が運動器官として細胞から突出したらせん状の繊維を回転させることで運動していることが報告された⁽²⁾。同時に、この運動器官によって細胞が水溶液中を遊泳するだけでなく、固体表面を移動していることや方向変換していることが分かった。また、細菌は無作為に運動している訳ではなく、より良い生育環境に向かって運動していることが報告された⁽³⁾。

運動性を有する細菌のらせん状の繊維はべん毛(flagellum)と呼ばれる。原核生物のべん毛はべん毛繊維を 1 本またはべん毛繊維を束ねて回転することで推進力を得ている(図 1-1)。

細菌は地球上のありとあらゆる環境で生育している。海水中や土壌中に生育している細菌でもべん毛を運動器官として持っていることが知られている。

この細菌が持つべん毛の構造は人工モーターと構造が類似している。生物分子モーターとしては、筋繊維の滑り運動を行うアクチン、ミオシン系や微小管 - ダイニン系などのリニアモータータイプと、ATP の合成分解を行う ATPase や細菌の運動機構であり回転運動を行うべん毛の回転モータータイプが存在する。細菌のべん毛は現在知られている運動器官として利用されている生物モーターの中で唯一の回転モーターである。



図 1-1. 大腸菌のべん毛繊維の概略図

細菌は、細胞から突出したべん毛と呼ばれるらせん状の繊維を回転することで推進力を得ている。大腸菌は、細胞表面に 6 本程度のべん毛を形成する。べん毛を反時計回転することでべん毛を収束し推進力を得る。また、べん毛を時計回転することで方向転換を行う。

第二節 ベン毛の形態と構造

ベン毛の形態は細菌の種類と同様に多様である(図 1-2)。大腸菌やサルモネラ菌や枯草菌などは菌体の周囲に数本のベン毛を有する周ベン毛性である。また、緑膿菌は菌体の極に単一のベン毛を有する極ベン毛性である。更に、海洋性 *Vibrio* 属細菌は極ベン毛と側ベン毛の 2 種類のベン毛を有する。このようにベン毛の形態は、細菌の同定の指標の一つとして用いられほど特徴的である⁽⁴⁾。ベン毛の形態は多様であるが基本的な構造や機能に関しては類似していることがこれまでの研究により報告されている⁽⁵⁾。

ベン毛の構造は、大きく分けて膜に埋まったモーター部分に相当する基部体、推進力を得るスクリュー部分に相当するベン毛繊維、基部体とベン毛繊維をつなぐフックの 3 か所から構成されている(図 1-3)。ベン毛は様々な機能を持つタンパク質から成っており、それらが超複合体を形成している。これまでの研究から、ベン毛モーターの形成や機能に関与している遺伝子は 50 個程あることが報告されている^(5,6)。

ベン毛モーターは、膜内外に形成される H^+ もしくは Na^+ 駆動力といった電気化学エネルギーを回転エネルギーに変化して駆動している⁽⁶⁾。大腸菌では、回転子構成タンパク質 FliG と FliM、FliN が基部体の細胞質側で C リングを形成している。これらは、C リングの細胞質側でスイッチ複合体として機能していることが分かっている^(5,7,8)。また、大腸菌のベン毛モーターにおいて駆動力の発生に関与すると考えられている H^+ 駆動型固定子 MotAB は MotA サブユニットと MotB サブユニットが 4 : 2 の割合で複合体を形成し、共役イオンの通り道であるイオンチャネルとして機能している^(9,11)。そして、回転子構成タンパク質 FliG の C 末端領域と固定子構成タンパク質 MotA の細胞質側に突出している親水性

ループ領域の静電的相互作用によりべん毛モーターは駆動していると考えられている⁽¹⁰⁾。べん毛モーターにおける回転に必要な因子はべん毛構築にも必要な因子である。べん毛モーターの回転機構を知るためには、モーターのエンジン部分にあたる基部体部分の解析が重要となってくる。

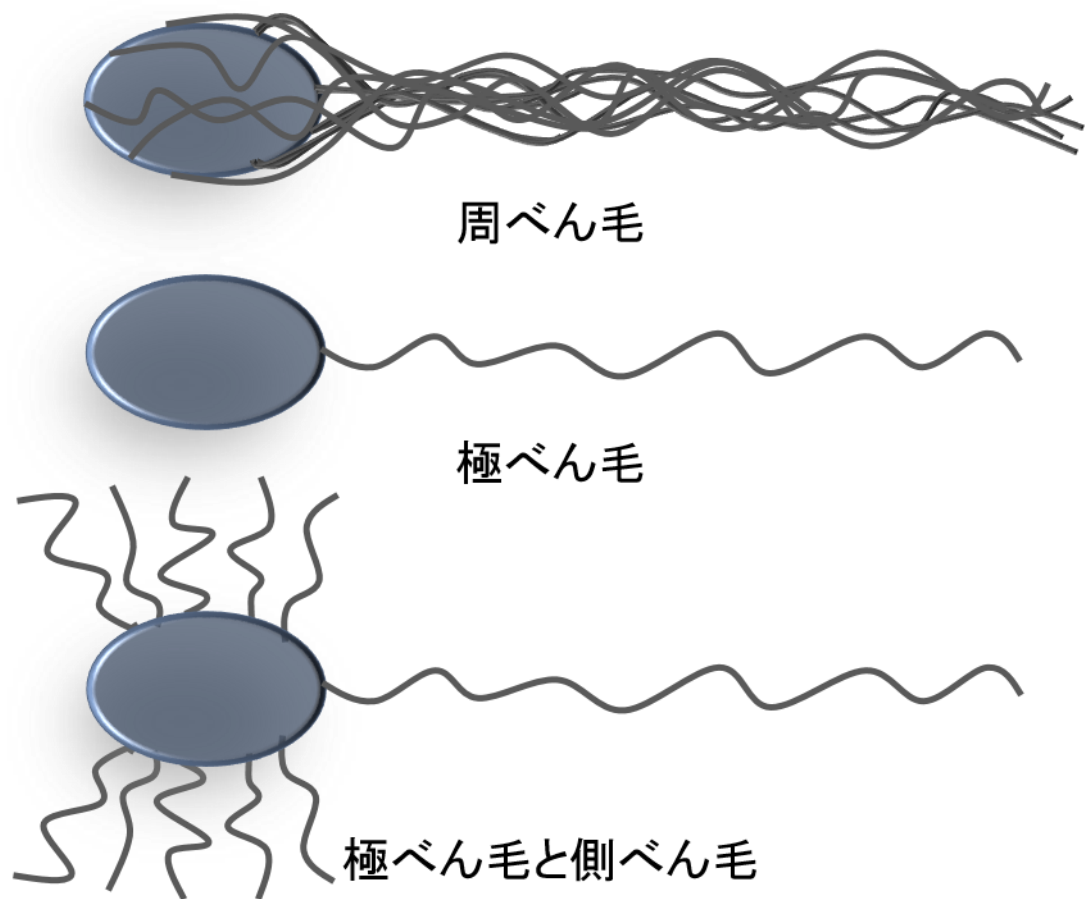


図 1-2. 細菌のべん毛形態の種類

べん毛の形態の種類は細菌の種によって多様である。周べん毛性は細胞の周囲にべん毛を形成する。極べん毛性は、細胞の極のみにべん毛を形成する。極べん毛と側べん毛は、細胞の極と側にそれぞれ形成される。また、極べん毛と側べん毛は、それぞれ異なるタンパク質から形成される。

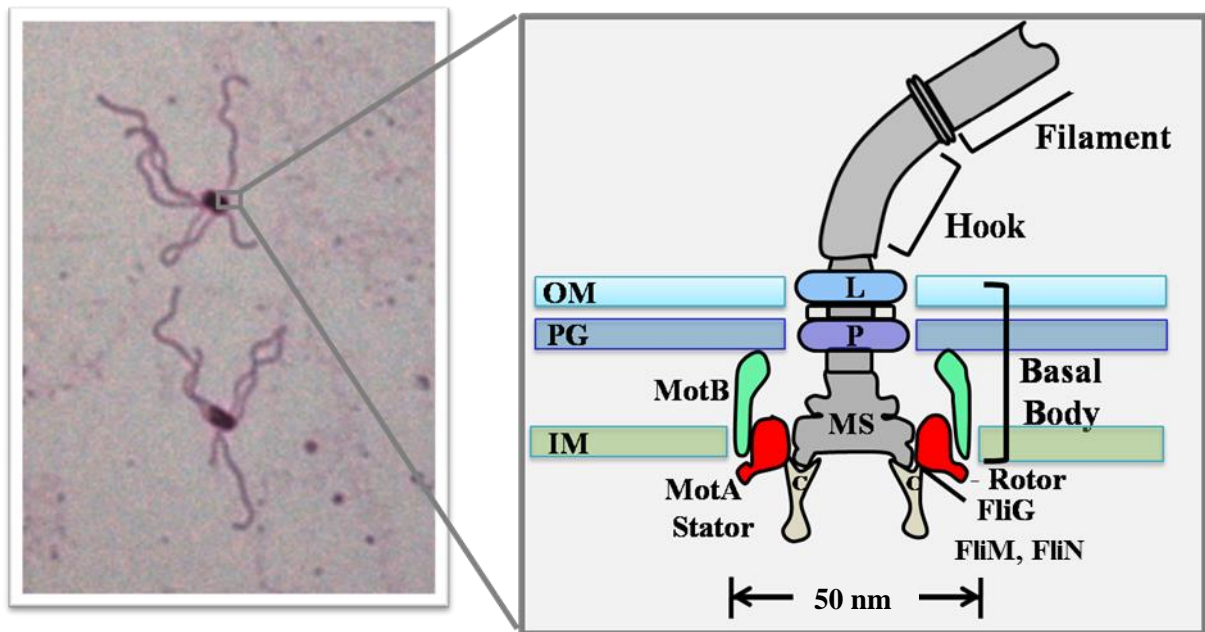


図 1-3. 大腸菌べん毛の染色写真とべん毛モーター概略図

OM：外膜、PG：ペプチドグリカン層、IM：内膜、L：L-ring、P：P-ring、MS：MS-ring、MotA：固定子サブユニット、MotB：固定子サブユニット、Stator：H⁺駆動型固定子 MotAB 複合体、FliG：C-ring サブユニット、FliM, FliN：C-ring サブユニット、C：C-ring、Rotor：C-ring FliG サブユニット

図 1-3 の左の写真は、大腸菌をべん毛染色したものである。大腸菌の細胞から数本のべん毛繊維が突出しているのが観察できる。右の図は、べん毛モーターの模式図を示した。べん毛モーターは、細胞外に長く伸びたべん毛繊維(Filament)とモーターの役割を持つ細胞内基部体(Basal Body)、そしてべん毛繊維と基部体をつなぐフック(Hook)から構成されている。

第三節 細菌の運動性における固定子の関与

大腸菌やサルモネラ菌などの細菌は、 H^+ 駆動型固定子 MotAB をべん毛モーターの駆動エネルギー変換ユニットとして利用している⁽⁶⁾。また、固定子の種類は、 H^+ 駆動型固定子 MotAB のほかに海洋性ビブリオ属細菌や *Bacillus* 属細菌がもつ Na^+ 駆動型固定子 PomAB と MotPS がある。

H^+ 駆動型固定子 MotAB を構成している MotA サブユニットは 4 回膜貫通領域、MotB サブユニットは 1 回膜貫通領域を持つ膜タンパク質である(図 1-4)^(7,9)。大腸菌では、MotAB がイオンチャネルとして機能し、チャネル内を共役イオンである H^+ が通過する時に MotAB 複合体が構造変化を起こし、MotA サブユニットの 2 番目と 3 番目の膜貫通領域の間の細胞質内ループの荷電アミノ酸残基と回転構成タンパク質 FliG の C 末端領域の荷電アミノ酸残基が静電的相互作用をすることによって駆動力が発生していると考えられている⁽¹⁰⁾。また、MotB サブユニットは、C 末端領域側にペプチドグリカン結合モチーフ(PGB)を有し、膜貫通領域内には共役イオン結合部位であるアスパラギン酸残基を持っている^(7,13,14)。MotAB はイオンチャネルとして機能し、チャネル内を共役イオンである H^+ が通過することで駆動力を発生する^(9,11)。しかし、固定子の詳細な構造はいまだ解明されていない。そのため、べん毛モーターの回転機構や固定子における共役イオンの流入機構などはいまだ不明な点が多い。

好アルカリ性 *Bacillus* 属細菌のべん毛は、 Na^+ を共役イオンとしてべん毛を回転させていることが 1981 年に報告された⁽¹⁵⁾。そして、2004 年に好アルカリ性細菌 *Bacillus pseudofirmus* OF4 から MotAB と相同性のある Na^+ 駆動型固定子 MotPS が同定された⁽¹⁶⁾(表 1-1、図 1-5)。好アルカリ性細菌は、アルカリ性環境では H^+ 駆動力が小さく、べん毛モーターの駆動力として使うことが困難となるため代

わりに Na^+ 駆動力を利用すると考えられている。近年の研究では、好アルカリ性 *Bacillus* 属細菌において新奇性の高い固定子が同定されている。*Bacillus clausii* KMS-K16 の固定子 MotAB は外環境の pH に適応して中性環境では H^+ を共役イオンとして利用し、アルカリ性環境では Na^+ を共役イオンとして利用していることが報告された⁽¹⁷⁾。また、*Bacillus alcalophils* から同定された固定子 MotPS は Na^+ だけでなく、 K^+ や Rb^+ をべん毛モーターの共役イオンとして利用できることが報告された⁽¹⁸⁾。

海洋性ビブリオ属細菌は、一つの菌体に極べん毛と側べん毛を有する。通常は Na^+ 駆動型固定子 PomAB により駆動する 1 本の極べん毛を回転させることで遊泳を行う^(19,20)。しかし、環境中の粘度が上がると大量の側べん毛を発現させる。側べん毛の回転は H^+ 駆動力を利用している。海洋性ビブリオ属細菌は、外環境によってべん毛を使い分けながら運動を行っている⁽²¹⁾。

2004 年に好アルカリ性細菌で同定された Na^+ 駆動型固定子 MotPS が好中性細菌である枯草菌でも同定された⁽¹⁶⁾。枯草菌のべん毛モーターは、2 種類の固定子を持ち、環境応答により固定子タンパク質の発現制御を行っていることが報告された⁽²²⁾。

2009 年に *Shewanella oneidensis* MR-1 は、極べん毛性で H^+ 駆動型固定子 MotAB と Na^+ 駆動型固定子 PomAB が、環境中の Na^+ 濃度や pH の変化により、基部位に取り込む固定子の種類を変化させていることが報告された^(23,24)。枯草菌においても Na^+ 駆動型固定子 MotPS は、 Na^+ 濃度や pH の変化により発現量が変化することが報告された⁽²²⁾。

海洋性ビブリオ属細菌は、2 種類の固定子を極べん毛、側べん毛で使い分けていることで環境応答を行っている。また、好アルカリ性細菌である *Bacillus clausii* KMS-K16⁽¹⁷⁾や *Bacillus alcalophils*⁽¹⁸⁾は 1 種類の固定子で複数の共役イオンを利用

することで環境応答を行っている。しかし、枯草菌や *Shewanella oneidensis* MR-1 はべん毛や共役イオンを使い分けるのではなく、モーター部分である基部体に取り込む固定子の種類を変化させることにより環境応答を行っていることが報告された。これまでの研究から、枯草菌や *Shewanella oneidensis* MR-1 が H^+ 駆動型固定子と Na^+ 駆動型固定子が 1 つのべん毛モーター基部体に取り込まれる固定子レベルのハイブリッドモーターであることが報告された^(23,24,25)。

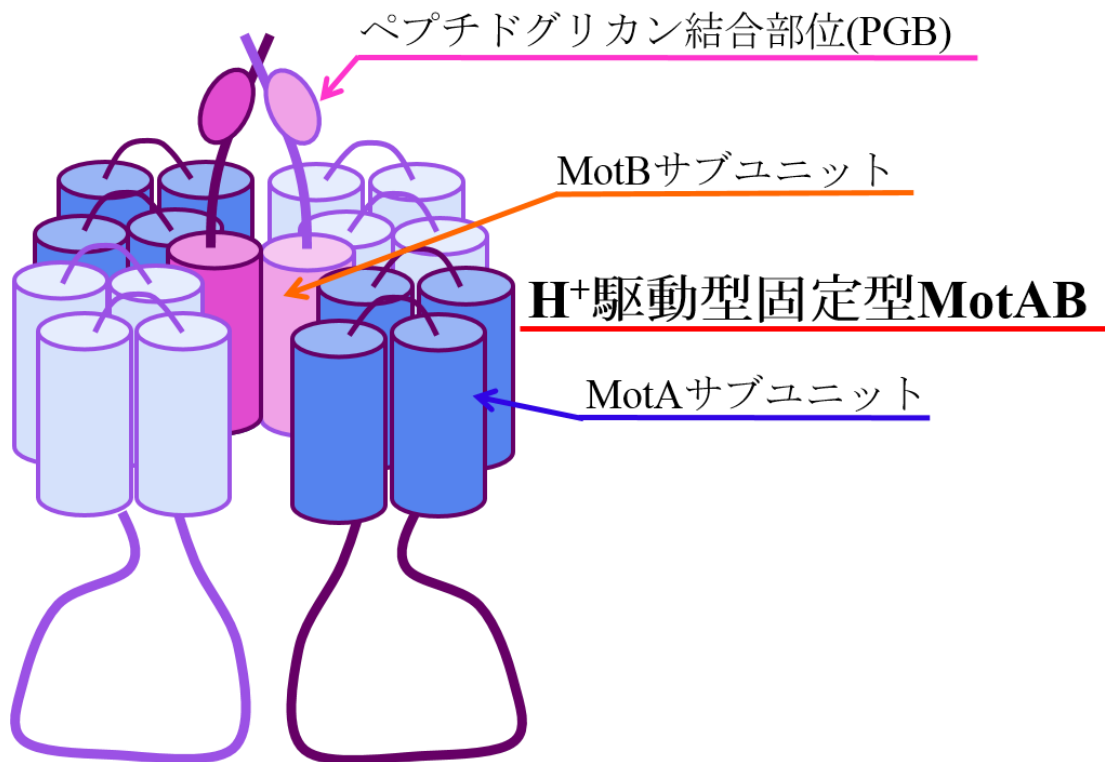


図 1-4. H^+ 駆動型固定子 MotAB 複合体の概略図

固定子構成タンパク質である MotA サブユニットを青色、MotB サブユニットを橙色のの矢印で示した。MotB サブユニットの C 末端側にペプチドグリカン結合部位(PGB)をピンク色の矢印で示した。

表 1-1. べん毛の種類と固定子と共役イオン

菌種	べん毛の 形態	固定子	共役イオン
大腸菌	周べん毛	MotAB	H ⁺
好アルカリ性細菌 <i>Bacillus psedofirmus</i> OF4	周べん毛	MotPS	Na ⁺
好アルカリ性細菌 <i>Bacillus clausii</i> KMS-K16	周べん毛	MotAB	H ⁺ , Na ⁺
好アルカリ性細菌 <i>Bacillus alcalophils</i>	周べん毛	MotPS	Na ⁺ , K ⁺ , Rb ⁺
海洋性ビブリオ属細菌	極べん毛	PomAB	Na ⁺
	側べん毛	MotAB	H ⁺
<i>Shewanella oneidensis</i> MR-1	周べん毛	MotAB	H ⁺
		PomAB	Na ⁺
枯草菌	周べん毛	MotAB	H ⁺
		MotPS	Na ⁺

固定子は従来 H⁺駆動型と考えられる MotAB を赤、Na⁺駆動型と考えられる MotPS と PomAB を青で示した。共役イオンは、H⁺を赤、Na⁺を青、K⁺を緑、Rb⁺をピンクで示した。

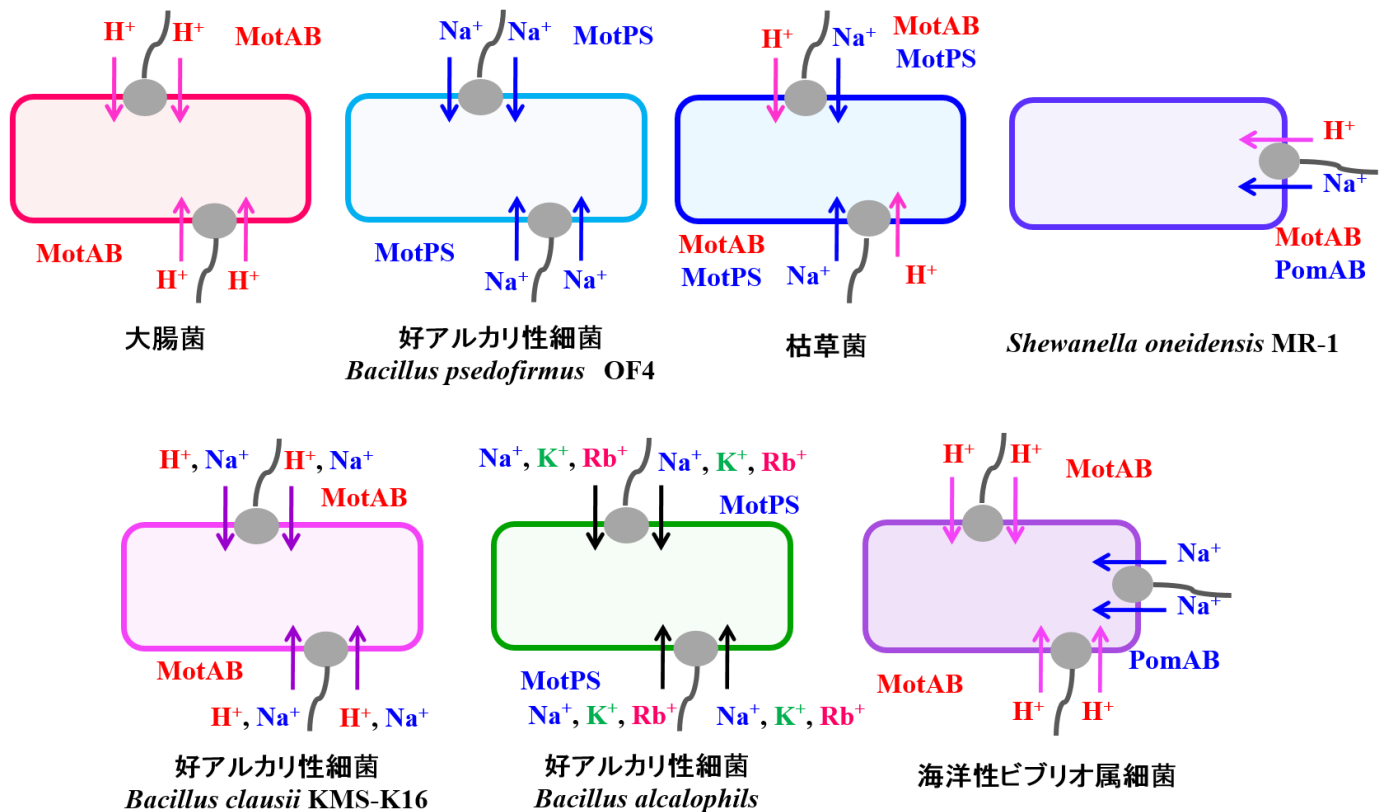


図 1-5. べん毛の種類と固定子と共役イオンの概略図

それぞれの細菌におけるべん毛の種類、固定子の種類、固定子の共役イオンを概略図で示した。固定子は従来 H⁺駆動型と考えられる MotAB を赤、Na⁺駆動型と考えられる MotPS と PomAB を青で示した。共役イオンは、H⁺を赤、Na⁺を青、K⁺を緑、Rb⁺をピンクで示した。

第四節 回転子タンパク質 FliG と固定子タンパク質の相互作用

大腸菌べん毛モーターは、C リング構成タンパク質 FliG が回転子として、H⁺ 駆動型 MotAB が固定子として機能することで駆動力が発生すると考えられている。これまでに、回転子構成タンパク質 FliG の C 末端領域の荷電アミノ酸残基(K264、R281、D288、D289、R297)^(26,27,28)と固定子構成タンパク質 MotA の 2 番目と 3 番目の膜貫通領域の間の細胞質内ループの荷電アミノ酸残基(R90、E98)⁽²⁹⁾が静電的相互作用することにより駆動力が発生すると提唱されている(図 1-6)⁽¹⁰⁾。

H⁺駆動型固定子構成タンパク質 MotA の 2 番目と 3 番目の膜貫通領域の間の細胞質内ループの荷電アミノ酸残基(R90、E98)は他の細菌の MotA において高度に保存されている。また、これらの荷電アミノ酸残基は、Na⁺駆動型固定子構成タンパク質である MotP、PomA においても高度に保存されている。近年の研究では、H⁺駆動型固定子構成タンパク質 MotA(E98)と回転子構成タンパク質 FliG(D289)間における静電的相互作用は、基部体に固定子を導入するために重要であると報告がなされた^(30,31)。

海洋性ビブリオ属細菌 *Vibrio alginolyticus* が持つ Na⁺駆動型固定子構成タンパク質 PomA において 2 番目と 3 番目の膜貫通領域の間の細胞質内ループの荷電アミノ酸残基(R88、R89、E96、E97、E99)を中性アミノ酸残基に置換した変異体の運動性試験の結果、運動性への影響を観察することが出来なかった^(32,33)。また、FliG の C 末端領域の荷電アミノ酸残基(K284、R301、D308、D309、R317)においても置換変異体による運動性試験を行ったが、置換変異による運動性への影響は観察出来なかった⁽³³⁾。これらの結果から、海洋性ビブリオ属細菌のべん毛モーターは、大腸菌のべん毛モーターで示されたような回転

子と固定子の間で静電的相互作用によって駆動力が発生するという説は支持されてこなかった。しかし、最近の研究によって、大腸菌の MotA と異なり、*V. alginolyticus* の PomA (R88、K89、E96、E97、E99、D128、H136) と FliG (K284、K300、R301、D308、D309、R317) 間の静電的相互作用に多くの荷電アミノ酸残基が関与していることが報告された(図 1-7)⁽³⁵⁾。このことから、PomA と FliG 間の静電的相互作用がべん毛モーターの回転に重要な役割を果たしていると考えられる。

本実験の研究対象である枯草菌は、H⁺駆動型 MotAB と Na⁺駆動型 MotPS の 2 種類の固定子が 1 つのべん毛モーターに組み込まれ、機能するハイブリッドモーターである。大腸菌や海洋性 *Vibrio* 属細菌によって固定子と回転子における荷電アミノ酸残基間の静電的相互作用がべん毛モーターの回転機構に関与していることが考えられている。しかし、H⁺駆動型固定子構成タンパク質 MotA と Na⁺駆動型固定子構成タンパク質 PomA では、静電的相互作用に必要とする荷電アミノ酸残基の数が異なることから駆動力の発生に関与する静電的相互作用様式が異なる可能性が考えられた。また、これまで Na⁺駆動型 MotPS において回転子構成タンパク質 FliG との相互作用に関する報告はない。このことから、H⁺駆動型 MotAB と Na⁺駆動型 MotPS の 2 種類の固定子が 1 つのべん毛モーターに組み込まれている枯草菌は、H⁺駆動型 MotAB と Na⁺駆動型 MotPS の回転子構成タンパク質 FliG との静電的相互作用を比較するには、好都合な実験材料であるといえる。

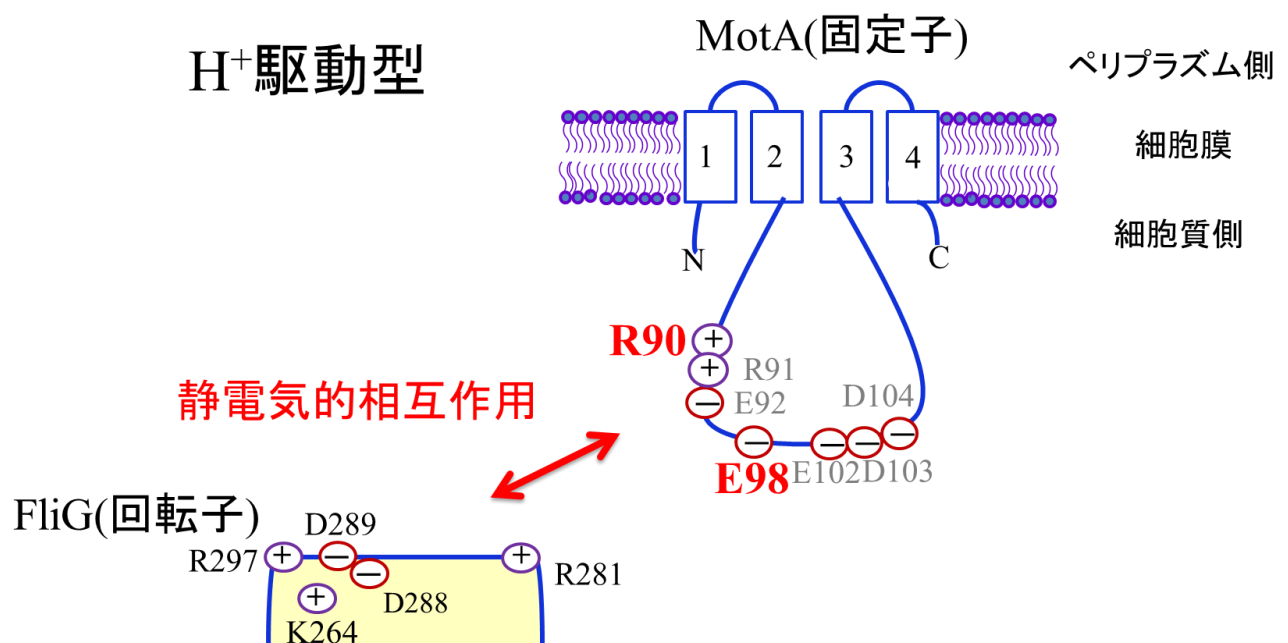


図 1-6. 大腸菌べん毛モーターH⁺駆動型固定子 MotAB と回転子 FliG との相互作用模式図

大腸菌べん毛モーターの駆動力の発生に特に重要な H⁺駆動型固定子構成タンパク質 MotA の荷電アミノ酸残基である 90 番目のアルギニン残基(**R90**)と 98 番目のグルタミン酸残基(**E98**)を赤で示した。R90 は駆動力の発生に重要であり、E98 は基部体に固定子を導入するために重要であることが報告されている^(30,31)。固定子と FliG の C 末端領域間の静電的相互作用を赤色の矢印で示した。MotA サブユニットの膜貫通領域の順番を四角内の数字は示している。

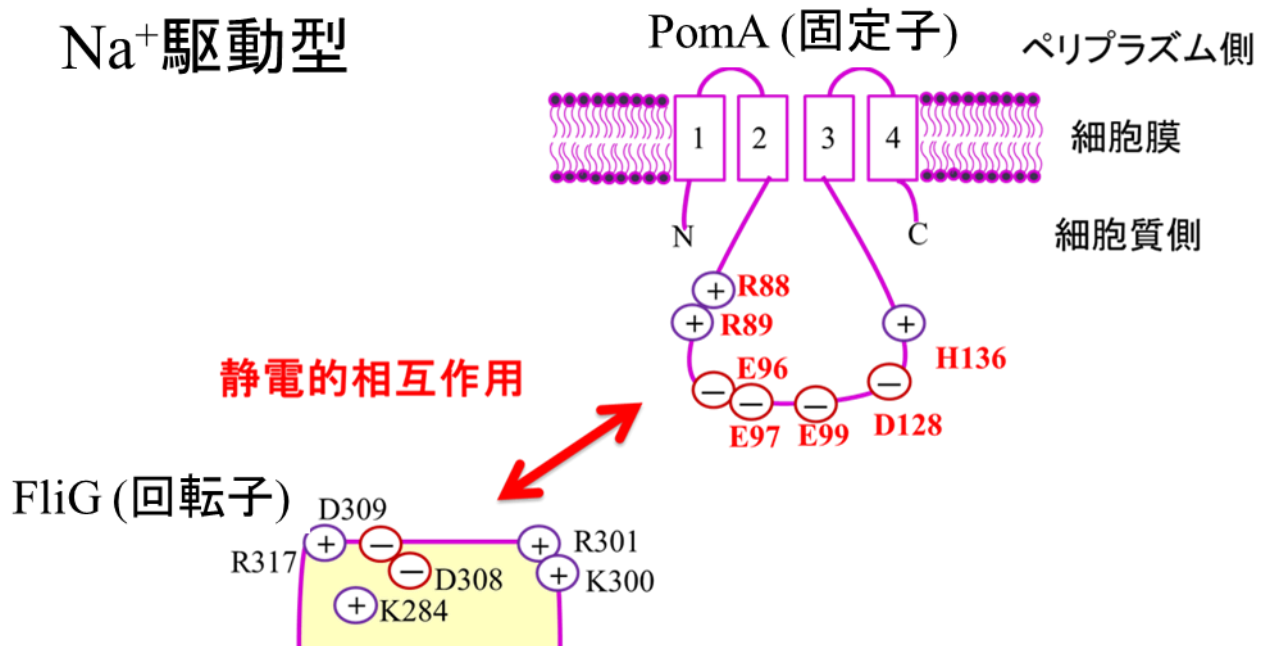


図 1-7. *V. alginolyticus* ベン毛モーターNa⁺駆動型固定子 PomAB と回転子 FliG

との相互作用模式図

V. alginolyticus のベン毛モーターの運動性に関与していると考えられる Na⁺駆動型固定子構成タンパク質 PomA の荷電アミノ酸残基(R88、R89、E96、E97、E99、D128、H136)と回転子構成タンパク質 FliG の C 末端領域に存在する荷電アミノ酸残基(K284、K300、R301、D308、D309、R317)を図中に示した。また、固定子と FliG の C 末端側間の静電的相互作用を赤色の矢印で示した。

PomA サブユニットの膜貫通領域の順番を四角内の数字は示している。

第五節 本論文の章立て

本研究では、*Bacillus* 属細菌のべん毛モーター固定子に着目した。枯草菌の 2 種類の固定子 H^+ 駆動型 MotAB と Na^+ 駆動型 MotPS と好アルカリ性細菌 *Bacillus pseudofirmus* OF4 の Na^+ 駆動型 MotPS を研究対象とした。

これまで *Bacillus* 属細菌のべん毛モーターにおける駆動力の発生や固定子の分子生物学的手法を用いたイオン透過機構に関する研究はほとんど行われていない。駆動力の発生機構は、 H^+ 駆動型と Na^+ 駆動型共に回転子との荷電アミノ酸残基間の静電的相互作用が関与していると考えられている。しかし、 H^+ 駆動型 MotA サブユニットと Na^+ 駆動型の PomA サブユニットでは、静電的相互作用に必要とする荷電アミノ酸残基の数が異なる。このことから、静電的相互作用の駆動力の発生への関与が異なる可能性が考えられた。枯草菌は、 H^+ 駆動型固定子 MotAB と Na^+ 駆動型固定子 MotPS の 2 種類が 1 つのべん毛モーター基部位に取り込まれるハイブリッドモーターを形成している点から H^+ 駆動型と Na^+ 駆動型の駆動力の発生機構を比較するには好都合な研究材料といえる。また、これまで Na^+ 駆動型固定子 MotPS における駆動力の発生機構に関する報告はない。

Na^+ 駆動型固定子 MotPS は、好アルカリ性 *Bacillus* 属細菌から同定された Na^+ 駆動型固定子である。アルカリ性環境を好む好アルカリ性細菌は、 H^+ 駆動力が利用しづらいために、べん毛モーターの駆動力に Na^+ 駆動力を利用している。*B. pseudofirmus* OF4 は通性好アルカリ性細菌であり、中性環境でも生育することが可能である。*B. pseudofirmus* OF4 は、pH 7.5~11.4 において Na^+ 濃度に依存した良好な運動性を示す。しかし、中性である pH 7.0 では運動性に高濃度の Na^+ を要求する⁽³⁹⁾。中性環境における運動性減少の原因として、 H^+ と Na^+ の競合阻害による影響が考えられている。しかし、枯草菌は中性環境でも Na^+ 濃度に依存した良

好な運動性を示す⁽¹⁶⁾。このことから、好中性細菌である枯草菌べん毛モーターの Na⁺駆動型固定子 MotPS と好アルカリ性細菌である *B. pseudofirmus* OF4 のべん毛モーターの Na⁺駆動型固定子 MotPS は、Na⁺の流入に対して外環境 pH に応答した異なる制御を行っている可能性が考えられた。*B. pseudofirmus* OF4 のべん毛モーターの Na⁺駆動型固定子 MotPS の中性環境における Na⁺の流入制御部位を特定することで固定子の外環境 pH に応答する部位を特定できるのではないかと考えた。

本研究の目的は、枯草菌のべん毛モーターH⁺駆動型固定子 MotAB と Na⁺駆動型固定子 MotPS の回転駆動力発生ユニットとしての機能と *B. pseudofirmus* OF4 のべん毛モーターNa⁺駆動型固定子 MotPS の中性環境での Na⁺の流入制御機構を解明することである。

第二章では、枯草菌べん毛モーターの H⁺駆動型固定子 MotAB の MotA サブユニットと Na⁺駆動型固定子 MotPS の MotP サブユニットの 2 番目と 3 番目の膜貫通領域の間に存在する細胞質内ループの保存性の高い荷電アミノ酸残基を選定した。保存性の高い荷電アミノ酸残基を中心に周囲に存在する荷電アミノ酸残基を中性または逆の荷電を持つアミノ酸残基に置換した変異体を作製した。作製した変異体の運動性や固定子の発現量などの生理学試験を行うことで、運動性に重要な荷電アミノ酸残基の特定を行った。

第三章では、枯草菌べん毛モーター固定子のイオンチャネルとしての機能について解析を行った。枯草菌べん毛モーター固定子において、共役イオン結合部位と推定されるアスパラギン酸残基を他のアミノ酸残基に置換したアミノ酸残基置換変異株や運動性向上株の運動性試験や生理学的解析を行うことで、共役イオンの透過機構の解析を試みた。

第四章では、*B. pseudofirmus* OF4 と枯草菌のべん毛モーターNa⁺駆動型固定子

MotPS の中性環境における Na^+ 親和性の差異について解析を行った。*B. pseudofirmus* OF4 のべん毛モーター Na^+ 駆動型固定子 MotPS を枯草菌固定子欠損株に導入した株から中性環境における運動性復帰株を取得した。また、取得した運動性復帰株から中性環境での低 Na^+ 濃度下における運動性向上株を取得した。これらの取得した運動性復帰株や運動性向上株の運動性の復帰または向上に関わる変異箇所の同定や解析を行うことで *B. pseudofirmus* OF4 の Na^+ 駆動型固定子 MotPS の中性環境における Na^+ の流入制御部位の特定を試みた。

第五章では、以上の研究から明らかになったことを、今後の研究の展開を含め総括としてまとめた。

第二章 枯草菌べん毛モーターH⁺駆動型固定子 MotAB と Na⁺駆動

型固定子 MotPS の回転駆動力の発生に重要なアミノ酸残基 の特定と解析

第一節 緒言

一般に細菌の運動器官であるべん毛は、回転子構成タンパク質 FliG と固定子構成タンパク質 MotA が静電的相互作用することにより駆動力を発生していると考えられている⁽¹⁰⁾。アメリカのユタ大学の Blair らのグループは、大腸菌の H⁺駆動型べん毛モーターの研究により回転子 FliG の C 末端領域に存在する荷電アミノ酸残基(K264、R281、D288、D289、R297)と H⁺駆動型固定子 MotA サブユニットの 2 番目と 3 番目の膜貫通領域の間に存在する細胞質内ループの荷電アミノ酸残基(R90、E98)が静電的相互作用を行うことで駆動力が発生すると報告している(図1-6)^(10,28,29)。MotA サブユニットの 90 番目のアルギニン残基と 98 番目のグルタミン酸残基の荷電を逆または無荷電アミノ酸残基に置換した変異株の運動性は、低下または欠損株と同様の表現形を示した。また、同様の荷電を持つ荷電アミノ酸残基に置換した変異株は野生株の 80%程度の運動性を示した。これらの結果から、固定子と回転子が静電的相互作用を行うことにより駆動力が発生していると提唱した⁽²⁹⁾。また、Na⁺駆動型固定子における研究において回転子タンパク質 FliG との静電的相互作用における駆動力の発生はこれまで確認されていなかった。しかし、最近の研究によって、*V. alginolyticus* の Na⁺駆動型固定子構成タンパク質 PomA(R88、K89、E96、E97、E99、D128、H136)と回転子 FliG(K284、K300、R301、D308、D309、R317)間の静電的相互

作用に多くの荷電アミノ酸残基が関与していることが報告された(図 1-7)⁽³⁵⁾。また、近年の研究では H⁺駆動型固定子 MotA(R90)と回転子 FliG(D289)間における静電的相互作用は、基部体に固定子を組み込むために重要であることが報告された^(30,31)。

枯草菌には、2 種類の固定子 H⁺駆動型 MotAB と Na⁺駆動型 MotPS が存在する。それぞれの固定子の駆動力の発生機構の解明を試みるためには、H⁺駆動型 MotAB または Na⁺駆動型 MotPS がそれぞれ固定子として単独で発現している株を用いて解析した方が、もう一方の影響を排除して研究できる利点がある。

本章では、使用菌株としてあらかじめ *motAB* および *motPS* 遺伝子を欠失させた枯草菌固定子欠損株に H⁺駆動型固定子 MotA サブユニットまたは Na⁺駆動型固定子 MotP サブユニットの 2 番目と 3 番目の膜貫通領域の間に存在する細胞質内ループの荷電アミノ酸残基を無電荷または逆の荷電アミノ酸残基に置換した固定子遺伝子を導入した置換変異株を用いた。置換変異株の比較対象として、枯草菌の野生型の固定子遺伝子(*motAB* または *motPS*)を導入した株を野生株として用いた。置換変異株の生理学試験を行うことで、駆動力の発生に重要な役割を持つ荷電アミノ酸残基の特定を試みた。

第二節 実験材料と方法

第一項 実験材料

1. 使用菌株、使用プラスミド

本研究で使用した菌株を表 2-1 に、使用したプラスミドを表 2-2 にまとめた。大腸菌の培養には LB 培地を使用した。大腸菌形質転換体の培養には、必要に応じて LB 培地に 100 µg/ml なるようにアンピシリンナトリウム(以降 Amp¹⁰⁰ と省略)を添加した。枯草菌の培養には LB 培地または Spizizen 培地を使用した。抗生物質は、菌株に合わせて適宜添加した。エリスロマイシンは 1 µg/ml(以降 Erm¹ と省略)、クロラムフェニコールは 5 µg/ml(以降 Cm⁵ と省略)、ネオマイシンは 7.5 µg/ml(以降 Neo^{7.5} と省略)。軟寒天培地を用いた運動性試験には、Spizizen 培地に 0.25% の Noble Agar(Becton Dickinson 社)を加えた軟寒天培地を使用した。

表2-1. 使用菌株

菌株	遺伝子型または説明	リファレンス
大腸菌(<i>Escherichia coli</i>)		
DH5 α MCR	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ 1 (<i>mrr-hsd RMS-mcrBC</i>) Φ 80 <i>dlacZ</i> Δ (<i>lacZYAargF</i>) <i>U169 deoR recA1 endA1 supE44</i> λ <i>thi-1 gyr-496 relA1</i>	Stratagene
DH5 α -T1 ^R	<i>hsdR17(rk-, mk+)</i> <i>phoA</i> from DH5 α MCR	Invitrogen
枯草菌(<i>Bacillus subtilis</i>)		
BR151MA	<i>lys3 trpC2</i> (wild type)	(37)
Δ AB Δ PS	<i>lys3 trpC2</i> Δ <i>motAB::erm</i> Δ <i>motPS::neo</i>	(25)
BS-AB	Δ AB Δ PS <i>amyE::P_{motAB}-motAB</i> from BR151MA	(25)
BS-PS	Δ AB Δ PS <i>amyE::P_{motAB}-motPS</i> from BR151MA	(25)
BS-la-AB	Δ AB Δ PS <i>lacA::P_{motAB}-motAB</i> from BR151MA	本研究
BS-la-PS	Δ AB Δ PS <i>lacA::P_{motAB}-motPS</i> from BR151MA	本研究
P _{XylA} -AB	Δ AB Δ PS <i>lacA::P_{xylA}-motAB</i> from BR151MA	本研究
P _{XylA} -PS	Δ AB Δ PS <i>lacA::P_{xylA}-motPS</i> from BR151MA	本研究
AB-I	Δ AB Δ PS <i>amyE::P_{spac}-motAB</i> from BR151MA	本研究
PS-I	Δ AB Δ PS <i>amyE::P_{spac}-motPS</i> from BR151MA	本研究
P _{spac} -AB-WT	BS-la-AB <i>amyE::P_{spac}-motAB</i> from BR151MA	本研究
P _{spac} -PS-WT	BS-la-AB <i>amyE::P_{spac}-motPS</i> from BR151MA	本研究
MotA-E84A	Δ AB Δ PS <i>amyE::P_{motAB}-motAB-MotA_E84A</i>	本研究
MotA-E84Q	Δ AB Δ PS <i>amyE::P_{motAB}-motAB-MotA_E84Q</i>	本研究
MotA-R90A	Δ AB Δ PS <i>amyE::P_{motAB}-motAB-MotA_R90A</i>	本研究
MotA-R90E	Δ AB Δ PS <i>amyE::P_{motAB}-motAB-MotA_R90E</i>	本研究
MotA-R91A	Δ AB Δ PS <i>amyE::P_{motAB}-motAB-MotA_R91A</i>	本研究
MotA-E92A	Δ AB Δ PS <i>amyE::P_{motAB}-motAB-MotA_E92A</i>	本研究
MotA-E92Q	Δ AB Δ PS <i>amyE::P_{motAB}-motAB-MotA_E92Q</i>	本研究
MotA-E92K	Δ AB Δ PS <i>amyE::P_{motAB}-motAB-MotA_E92K</i>	本研究
MotA-E98A	Δ AB Δ PS <i>amyE::P_{motAB}-motAB-MotA_E98A</i>	本研究
MotA-E98Q	Δ AB Δ PS <i>amyE::P_{motAB}-motAB-MotA_E98Q</i>	本研究
MotA-E102A	Δ AB Δ PS <i>amyE::P_{motAB}-motAB-MotA_E102A</i>	本研究
MotA-E102Q	Δ AB Δ PS <i>amyE::P_{motAB}-motAB-MotA_E102Q</i>	本研究
MotA-D103A	Δ AB Δ PS <i>amyE::P_{motAB}-motAB-MotA_D103A</i>	本研究
MotA-D103N	Δ AB Δ PS <i>amyE::P_{motAB}-motAB-MotA_D103N</i>	本研究

表 2-1. 使用菌株（ 続き ）

菌株	遺伝子型または説明	リファレンス
枯草菌(<i>Bacillus subtilis</i>)		
MotA-D105A	$\Delta AB\Delta PS$ <i>amyE::P_{motAB}-motAB</i> -MotA_D105A	本研究
MotA-D105N	$\Delta AB\Delta PS$ <i>amyE::P_{motAB}-motAB</i> -MotA_D105N	本研究
MotA-D106A	$\Delta AB\Delta PS$ <i>amyE::P_{motAB}-motAB</i> -MotA_D106A	本研究
MotA-D106N	$\Delta AB\Delta PS$ <i>amyE::P_{motAB}-motAB</i> -MotA_D106N	本研究
MotA-E84A-I	$\Delta AB\Delta PS$ <i>amyE::P_{spac}-motAB</i> -MotA_E84A	本研究
MotA-E84Q-I	$\Delta AB\Delta PS$ <i>amyE::P_{spac}-motAB</i> -MotA_E84Q	本研究
MotA-R90A-I	$\Delta AB\Delta PS$ <i>amyE::P_{spac}-motAB</i> -MotA_R90A	本研究
MotA-R90E-I	$\Delta AB\Delta PS$ <i>amyE::P_{spac}-motAB</i> -MotA_R90E	本研究
MotA-R91A-I	$\Delta AB\Delta PS$ <i>amyE::P_{spac}-motAB</i> -MotA_R91A	本研究
MotA-E92A-I	$\Delta AB\Delta PS$ <i>amyE::P_{spac}-motAB</i> -MotA_E92A	本研究
MotA-E92Q-I	$\Delta AB\Delta PS$ <i>amyE::P_{spac}-motAB</i> -MotA_E92Q	本研究
MotA-E92K-I	$\Delta AB\Delta PS$ <i>amyE::P_{spac}-motAB</i> -MotA_E92K	本研究
MotA-E98A-I	$\Delta AB\Delta PS$ <i>amyE::P_{spac}-motAB</i> -MotA_E98A	本研究
MotA-E98Q-I	$\Delta AB\Delta PS$ <i>amyE::P_{spac}-motAB</i> -MotA_E98Q	本研究
MotA-E102A-I	$\Delta AB\Delta PS$ <i>amyE::P_{spac}-motAB</i> -MotA_E102A	本研究
MotA-E102Q-I	$\Delta AB\Delta PS$ <i>amyE::P_{spac}-motAB</i> -MotA_E102Q	本研究
MotA-D103A-I	$\Delta AB\Delta PS$ <i>amyE::P_{spac}-motAB</i> -MotA_D103A	本研究
MotA-D103N-I	$\Delta AB\Delta PS$ <i>amyE::P_{spac}-motAB</i> -MotA_D103N	本研究
MotA-D105A-I	$\Delta AB\Delta PS$ <i>amyE::P_{spac}-motAB</i> -MotA_D105A	本研究
MotA-D105N-I	$\Delta AB\Delta PS$ <i>amyE::P_{spac}-motAB</i> -MotA_D105N	本研究
MotA-D106A-I	$\Delta AB\Delta PS$ <i>amyE::P_{spac}-motAB</i> -MotA_D106A	本研究
MotA-D106N-I	$\Delta AB\Delta PS$ <i>amyE::P_{spac}-motAB</i> -MotA_D106N	本研究
<i>P_{spac}</i> -MotA-E84A	BS-la-AB <i>amyE::P_{spac}-motAB</i> -MotA_E84A	本研究
<i>P_{spac}</i> -MotA-E84Q	BS-la-AB <i>amyE::P_{spac}-motAB</i> -MotA_E84Q	本研究
<i>P_{spac}</i> -MotA-R90A	BS-la-AB <i>amyE::P_{spac}-motAB</i> -MotA_R90A	本研究
<i>P_{spac}</i> -MotA-R90E	BS-la-AB <i>amyE::P_{spac}-motAB</i> -MotA_R90E	本研究
<i>P_{spac}</i> -MotA-R91A	BS-la-AB <i>amyE::P_{spac}-motAB</i> -MotA_R91A	本研究
<i>P_{spac}</i> -MotA-E92A	BS-la-AB <i>amyE::P_{spac}-motAB</i> -MotA_E92A	本研究
<i>P_{spac}</i> -MotA-E92Q	BS-la-AB <i>amyE::P_{spac}-motAB</i> -MotA_E92Q	本研究
<i>P_{spac}</i> -MotA-E92K	BS-la-AB <i>amyE::P_{spac}-motAB</i> -MotA_E92K	本研究
<i>P_{spac}</i> -MotA-E98A	BS-la-AB <i>amyE::P_{spac}-motAB</i> -MotA_E98A	本研究

表 2-1. 使用菌株 (続き)

菌株	遺伝子型または説明	リファレンス
枯草菌(<i>Bacillus subtilis</i>)		
P _{spac} -MotA-E98Q	BS-la-AB <i>amyE</i> ::P _{spac} - <i>motAB</i> -MotA_E98Q	本研究
P _{spac} -MotA-E102A	BS-la-AB <i>amyE</i> ::P _{spac} - <i>motAB</i> -MotA_E102A	本研究
P _{spac} -MotA-E102Q	BS-la-AB <i>amyE</i> ::P _{spac} - <i>motAB</i> -MotA_E102Q	本研究
P _{spac} -MotA-D103A	BS-la-AB <i>amyE</i> ::P _{spac} - <i>motAB</i> -MotA_D103A	本研究
P _{spac} -MotA-D103N	BS-la-AB <i>amyE</i> ::P _{spac} - <i>motAB</i> -MotA_D103N	本研究
P _{spac} -MotA-D105A	BS-la-AB <i>amyE</i> ::P _{spac} - <i>motAB</i> -MotA_D105A	本研究
P _{spac} -MotA-D105N	BS-la-AB <i>amyE</i> ::P _{spac} - <i>motAB</i> -MotA_D105N	本研究
P _{spac} -MotA-D106A	BS-la-AB <i>amyE</i> ::P _{spac} - <i>motAB</i> -MotA_D106A	本研究
P _{spac} -MotA-D106N	BS-la-AB <i>amyE</i> ::P _{spac} - <i>motAB</i> -MotA_D106N	本研究
MotP-D91A	Δ AB Δ PS <i>amyE</i> ::P _{<i>motAB</i>} - <i>motPS</i> -MotP_D91A	本研究
MotP-D91N	Δ AB Δ PS <i>amyE</i> ::P _{<i>motAB</i>} - <i>motPS</i> -MotP_D91N	本研究
MotP-D91K	Δ AB Δ PS <i>amyE</i> ::P _{<i>motAB</i>} - <i>motPS</i> -MotP_D91K	本研究
MotP-R94A	Δ AB Δ PS <i>amyE</i> ::P _{<i>motAB</i>} - <i>motPS</i> -MotP_R94A	本研究
MotP-R94E	Δ AB Δ PS <i>amyE</i> ::P _{<i>motAB</i>} - <i>motPS</i> -MotP_R94E	本研究
MotP-K95A	Δ AB Δ PS <i>amyE</i> ::P _{<i>motAB</i>} - <i>motPS</i> -MotP_K95A	本研究
MotP-D102A	Δ AB Δ PS <i>amyE</i> ::P _{<i>motAB</i>} - <i>motPS</i> -MotP_D102A	本研究
MotP-D102N	Δ AB Δ PS <i>amyE</i> ::P _{<i>motAB</i>} - <i>motPS</i> -MotP_D102N	本研究
MotP-D102K	Δ AB Δ PS <i>amyE</i> ::P _{<i>motAB</i>} - <i>motPS</i> -MotP_D102K	本研究
MotP-D103A	Δ AB Δ PS <i>amyE</i> ::P _{<i>motAB</i>} - <i>motPS</i> -MotP_D103A	本研究
MotP-D103N	Δ AB Δ PS <i>amyE</i> ::P _{<i>motAB</i>} - <i>motPS</i> -MotP_D103N	本研究
MotP-R106A	Δ AB Δ PS <i>amyE</i> ::P _{<i>motAB</i>} - <i>motPS</i> -MotP_R106A	本研究
MotP-E107A	Δ AB Δ PS <i>amyE</i> ::P _{<i>motAB</i>} - <i>motPS</i> -MotP_E107A	本研究
MotP-E107Q	Δ AB Δ PS <i>amyE</i> ::P _{<i>motAB</i>} - <i>motPS</i> -MotP_E107Q	本研究
MotP-D110A	Δ AB Δ PS <i>amyE</i> ::P _{<i>motAB</i>} - <i>motPS</i> -MotP_D110A	本研究
MotP-D110N	Δ AB Δ PS <i>amyE</i> ::P _{<i>motAB</i>} - <i>motPS</i> -MotP_D110N	本研究
MotP-D110K	Δ AB Δ PS <i>amyE</i> ::P _{<i>motAB</i>} - <i>motPS</i> -MotP_D110K	本研究
MotP-D91A-I	Δ AB Δ PS <i>amyE</i> ::P _{spac} - <i>motPS</i> -MotP_D91A	本研究
MotP-D91N-I	Δ AB Δ PS <i>amyE</i> ::P _{spac} - <i>motPS</i> -MotP_D91N	本研究
MotP-D91K-I	Δ AB Δ PS <i>amyE</i> ::P _{spac} - <i>motPS</i> -MotP_D91K	本研究
MotP-R94A-I	Δ AB Δ PS <i>amyE</i> ::P _{spac} - <i>motPS</i> -MotP_R94A	本研究
MotP-R94E-I	Δ AB Δ PS <i>amyE</i> ::P _{spac} - <i>motPS</i> -MotP_R94E	本研究

表 2-1. 使用菌株（ 続き ）

菌株	遺伝子型または説明	リファレンス
枯草菌(<i>Bacillus subtilis</i>)		
MotP-K95A-I	$\Delta AB\Delta PS$ <i>amyE::P_{spac}-motPS</i> -MotP_K95A	本研究
MotP-D102A-I	$\Delta AB\Delta PS$ <i>amyE::P_{spac}-motPS</i> -MotP_D102A	本研究
MotP-D102N-I	$\Delta AB\Delta PS$ <i>amyE::P_{spac}-motPS</i> -MotP_D102N	本研究
MotP-D102K-I	$\Delta AB\Delta PS$ <i>amyE::P_{spac}-motPS</i> -MotP_D102K	本研究
MotP-D103A-I	$\Delta AB\Delta PS$ <i>amyE::P_{spac}-motPS</i> -MotP_D103A	本研究
MotP-D103N-I	$\Delta AB\Delta PS$ <i>amyE::P_{spac}-motPS</i> -MotP_D103N	本研究
MotP-R106A-I	$\Delta AB\Delta PS$ <i>amyE::P_{spac}-motPS</i> -MotP_R106A	本研究
MotP-E107A-I	$\Delta AB\Delta PS$ <i>amyE::P_{spac}-motPS</i> -MotP_E107A	本研究
MotP-E107Q-I	$\Delta AB\Delta PS$ <i>amyE::P_{spac}-motPS</i> -MotP_E107Q	本研究
MotP-D110A-I	$\Delta AB\Delta PS$ <i>amyE::P_{spac}-motPS</i> -MotP_D110A	本研究
MotP-D110N-I	$\Delta AB\Delta PS$ <i>amyE::P_{spac}-motPS</i> -MotP_D110N	本研究
MotP-D110K-I	$\Delta AB\Delta PS$ <i>amyE::P_{spac}-motPS</i> -MotP_D110K	本研究
<i>P_{spac}</i> -MotP-D91A	BS-la-PS <i>amyE::P_{spac}-motPS</i> -MotP_D91A	本研究
<i>P_{spac}</i> -MotP-D91N	BS-la-PS <i>amyE::P_{spac}-motPS</i> -MotP_D91N	本研究
<i>P_{spac}</i> -MotP-D91K	BS-la-PS <i>amyE::P_{spac}-motPS</i> -MotP_D91K	本研究
<i>P_{spac}</i> -MotP-R94A	BS-la-PS <i>amyE::P_{spac}-motPS</i> -MotP_R94A	本研究
<i>P_{spac}</i> -MotP-R94E	BS-la-PS <i>amyE::P_{spac}-motPS</i> -MotP_R94E	本研究
<i>P_{spac}</i> -MotP-K95A	BS-la-PS <i>amyE::P_{spac}-motPS</i> -MotP_K95A	本研究
<i>P_{spac}</i> -MotP-D102A	BS-la-PS <i>amyE::P_{spac}-motPS</i> -MotP_D102A	本研究
<i>P_{spac}</i> -MotP-D102N	BS-la-PS <i>amyE::P_{spac}-motPS</i> -MotP_D102N	本研究
<i>P_{spac}</i> -MotP-D102K	BS-la-PS <i>amyE::P_{spac}-motPS</i> -MotP_D102K	本研究
<i>P_{spac}</i> -MotP-D103A	BS-la-PS <i>amyE::P_{spac}-motPS</i> -MotP_D103A	本研究
<i>P_{spac}</i> -MotP-D103N	BS-la-PS <i>amyE::P_{spac}-motPS</i> -MotP_D103N	本研究
<i>P_{spac}</i> -MotP-R106A	BS-la-PS <i>amyE::P_{spac}-motPS</i> -MotP_R106A	本研究
<i>P_{spac}</i> -MotP-E107A	BS-la-PS <i>amyE::P_{spac}-motPS</i> -MotP_E107A	本研究
<i>P_{spac}</i> -MotP-E107Q	BS-la-PS <i>amyE::P_{spac}-motPS</i> -MotP_E107Q	本研究
<i>P_{spac}</i> -MotP-D110A	BS-la-PS <i>amyE::P_{spac}-motPS</i> -MotP_D110A	本研究
<i>P_{spac}</i> -MotP-D110N	BS-la-PS <i>amyE::P_{spac}-motPS</i> -MotP_D110N	本研究
<i>P_{spac}</i> -MotP-D110K	BS-la-PS <i>amyE::P_{spac}-motPS</i> -MotP_D110K	本研究

表 2-2. 使用プラスミド

プラスミド	説明	リファレンス
pGEM-7zf(+)	Cloning vector; Ap ^R	Promeg
pMW- <i>motAB</i>	pMW118+P _{<i>motAB-motAB</i>} from BR151MA	(38)
pMW- <i>motPS</i>	pMW118+P _{<i>motAB-motPS</i>} from BR151MA	(38)
pGEM-AB	pGEM-7(+)+P _{<i>motAB-motAB</i>} from BR151MA	本研究
pGEM-PS	pGEM-7(+)+P _{<i>motAB-motPS</i>} from BR151MA	本研究
pAX01	<i>lacA</i> integration vector with Em ^R gene and P _{<i>xylA</i>} promoter upstream of multiple cloning site	(39)
pAX-MotAB	pAX01+P _{<i>motAB-motAB</i>} from BR151MA	本研究
pAX-MotPS	pAX01+P _{<i>motAB-motPS</i>} from BR151MA	本研究
pAX-P _{<i>xylA</i>} -MotAB	pAX01+P _{<i>xylA-motAB</i>} from BR151MA	本研究
pAX-P _{<i>xylA</i>} -MotPS	pAX01+P _{<i>xylA-motPS</i>} from BR151MA	本研究
pDG-AB	pDG1730+P _{<i>motAB-motAB</i>} from BR151MA	(25)
pDG-PS	pDG1730+P _{<i>motAB-motPS</i>} from BR151MA	(25)
pDR67	<i>amyE</i> integration vector with Cm ^R gene and P _{<i>spac</i>} promoter upstream of multiple cloning site	(40)
pDR67 <i>motAB</i> -A_E84A	pDR67+P _{<i>motAB-motAB_E84A</i>}	本研究
pDR67 <i>motAB</i> -A_E84Q	pDR67+P _{<i>motAB-motAB_E84Q</i>}	本研究
pDR67 <i>motAB</i> -A_R90A	pDR67+P _{<i>motAB-motAB_R90A</i>}	本研究
pDR67 <i>motAB</i> -A_R90E	pDR67+P _{<i>motAB-motAB_R90E</i>}	本研究
pDR67 <i>motAB</i> -A_R91A	pDR67+P _{<i>motAB-motAB_R91A</i>}	本研究
pDR67 <i>motAB</i> -A_E92A	pDR67+P _{<i>motAB-motAB_E92A</i>}	本研究
pDR67 <i>motAB</i> -A_E92Q	pDR67+P _{<i>motAB-motAB_E92Q</i>}	本研究
pDR67 <i>motAB</i> -A_E92K	pDR67+P _{<i>motAB-motAB_E92K</i>}	本研究
pDR67 <i>motAB</i> -A_E98A	pDR67+P _{<i>motAB-motAB_E98A</i>}	本研究
pDR67 <i>motAB</i> -A_E98Q	pDR67+P _{<i>motAB-motAB_E98Q</i>}	本研究
pDR67 <i>motAB</i> -A_E102A	pDR67+P _{<i>motAB-motAB_E102A</i>}	本研究
pDR67 <i>motAB</i> -A_E102Q	pDR67+P _{<i>motAB-motAB_E102Q</i>}	本研究
pDR67 <i>motAB</i> -A_D103A	pDR67+P _{<i>motAB-motAB_D103A</i>}	本研究
pDR67 <i>motAB</i> -A_D103N	pDR67+P _{<i>motAB-motAB_D103N</i>}	本研究
pDR67 <i>motAB</i> -A_D105A	pDR67+P _{<i>motAB-motAB_D105A</i>}	本研究
pDR67 <i>motAB</i> -A_D105N	pDR67+P _{<i>motAB-motAB_D105N</i>}	本研究
pDR67 <i>motAB</i> -A_D106A	pDR67+P _{<i>motAB-motAB_D106A</i>}	本研究

表2-2. 使用プラスミド (続き)

プラスミド	説明	リファレンス
pDR67 <i>motAB</i> -A_D106N	pDR67+P _{<i>motAB</i>} - <i>motAB</i> _D106N	本研究
pDR67 <i>motPS</i> -P_D91A	pDR67+P _{<i>motAB</i>} - <i>motPS</i> -P_D91A	本研究
pDR67 <i>motPS</i> -P_D91N	pDR67+P _{<i>motAB</i>} - <i>motPS</i> -P_D91N	本研究
pDR67 <i>motPS</i> -P_D91K	pDR67+P _{<i>motAB</i>} - <i>motPS</i> -P_D91K	本研究
pDR67 <i>motPS</i> -P_R94A	pDR67+P _{<i>motAB</i>} - <i>motPS</i> -P_R94A	本研究
pDR67 <i>motPS</i> -P_R94E	pDR67+P _{<i>motAB</i>} - <i>motPS</i> -P_R94E	本研究
pDR67 <i>motPS</i> -P_K95A	pDR67+P _{<i>motAB</i>} - <i>motPS</i> -P_K95A	本研究
pDR67 <i>motPS</i> -P_D102A	pDR67+P _{<i>motAB</i>} - <i>motPS</i> -P_D102A	本研究
pDR67 <i>motPS</i> -P_D102N	pDR67+P _{<i>motAB</i>} - <i>motPS</i> -P_D102N	本研究
pDR67 <i>motPS</i> -P_D102K	pDR67+P _{<i>motAB</i>} - <i>motPS</i> -P_D102K	本研究
pDR67 <i>motPS</i> -P_D103A	pDR67+P _{<i>motAB</i>} - <i>motPS</i> -P_D103A	本研究
pDR67 <i>motPS</i> -P_D103N	pDR67+P _{<i>motAB</i>} - <i>motPS</i> -P_D103N	本研究
pDR67 <i>motPS</i> -P_R106A	pDR67+P _{<i>motAB</i>} - <i>motPS</i> -P_R106A	本研究
pDR67 <i>motPS</i> -P_E107A	pDR67+P _{<i>motAB</i>} - <i>motPS</i> -P_E107A	本研究
pDR67 <i>motPS</i> -P_E107Q	pDR67+P _{<i>motAB</i>} - <i>motPS</i> -P_E107Q	本研究
pDR67 <i>motPS</i> -P_D110A	pDR67+P _{<i>motAB</i>} - <i>motPS</i> -P_D110A	本研究
pDR67 <i>motPS</i> -P_D110N	pDR67+P _{<i>motAB</i>} - <i>motPS</i> -P_D110N	本研究
pDR67 <i>motPS</i> -P_D110K	pDR67+P _{<i>motAB</i>} - <i>motPS</i> -P_D110K	本研究
pDR67 P _{spac} - <i>motAB</i> -A_E84A	pDR67+P _{spac} - <i>motAB</i> _E84A	本研究
pDR67 P _{spac} - <i>motAB</i> -A_E84Q	pDR67+P _{spac} - <i>motAB</i> _E84Q	本研究
pDR67 P _{spac} - <i>motAB</i> -A_R90A	pDR67+P _{spac} - <i>motAB</i> _R90A	本研究
pDR67 P _{spac} - <i>motAB</i> -A_R90A	pDR67+P _{spac} - <i>motAB</i> _R90E	本研究
pDR67 P _{spac} - <i>motAB</i> -A_R91A	pDR67+P _{spac} - <i>motAB</i> _R91A	本研究
pDR67 P _{spac} - <i>motAB</i> -A_E92A	pDR67+P _{spac} - <i>motAB</i> _E92A	本研究
pDR67 P _{spac} - <i>motAB</i> -A_E92Q	pDR67+P _{spac} - <i>motAB</i> _E92Q	本研究
pDR67 P _{spac} - <i>motAB</i> -A_E92K	pDR67+P _{spac} - <i>motAB</i> _E92K	本研究
pDR67 P _{spac} - <i>motAB</i> -A_E98A	pDR67+P _{spac} - <i>motAB</i> _E98A	本研究
pDR67 P _{spac} - <i>motAB</i> -A_E98Q	pDR67+P _{spac} - <i>motAB</i> _E98Q	本研究
pDR67 P _{spac} - <i>motAB</i> -A_E102A	pDR67+P _{spac} - <i>motAB</i> _E102A	本研究
pDR67 P _{spac} - <i>motAB</i> -A_E102Q	pDR67+P _{spac} - <i>motAB</i> _E102Q	本研究
pDR67 P _{spac} - <i>motAB</i> -A_D103A	pDR67+P _{spac} - <i>motAB</i> _D103A	本研究
pDR67 P _{spac} - <i>motAB</i> -A_D103N	pDR67+P _{spac} - <i>motAB</i> _D103N	本研究

表2-2. 使用プラスミド (続き)

プラスミド	説明	リファレンス
pDR67 P _{spac} - <i>motAB</i> -A_D105A	pDR67+P _{spac} - <i>motAB</i> _D105A	本研究
pDR67 P _{spac} - <i>motAB</i> -A_d105N	pDR67+P _{spac} - <i>motAB</i> _D105N	本研究
pDR67 P _{spac} - <i>motAB</i> -A_D106A	pDR67+P _{spac} - <i>motAB</i> _D106A	本研究
pDR67 P _{spac} - <i>motAB</i> -A_D106N	pDR67+P _{spac} - <i>motAB</i> _D106N	本研究
pDR67 P _{spac} - <i>motPS</i> -P_D91A	pDR67+P _{spac} - <i>motPS</i> -P_D91A	本研究
pDR67 P _{spac} - <i>motPS</i> -P_D91N	pDR67+P _{spac} - <i>motPS</i> -P_D91N	本研究
pDR67 P _{spac} - <i>motPS</i> -P_D91K	pDR67+P _{spac} - <i>motPS</i> -P_D91K	本研究
pDR67 P _{spac} - <i>motPS</i> -P_R94A	pDR67+P _{spac} - <i>motPS</i> -P_R94A	本研究
pDR67 P _{spac} - <i>motPS</i> -P_R94E	pDR67+P _{spac} - <i>motPS</i> -P_R94E	本研究
pDR67 P _{spac} - <i>motPS</i> -P_K95A	pDR67+P _{spac} - <i>motPS</i> -P_K95A	本研究
pDR67 P _{spac} - <i>motPS</i> -P_D102A	pDR67+P _{spac} - <i>motPS</i> -P_D102A	本研究
pDR67 P _{spac} - <i>motPS</i> -P_D102N	pDR67+P _{spac} - <i>motPS</i> -P_D102N	本研究
pDR67 P _{spac} - <i>motPS</i> -P_D102K	pDR67+P _{spac} - <i>motPS</i> -P_D102K	本研究
pDR67 P _{spac} - <i>motPS</i> -P_D103A	pDR67+P _{spac} - <i>motPS</i> -P_D103A	本研究
pDR67 P _{spac} - <i>motPS</i> -P_D103N	pDR67+P _{spac} - <i>motPS</i> -P_D103N	本研究
pDR67 P _{spac} - <i>motPS</i> -P_R106A	pDR67+P _{spac} - <i>motPS</i> -P_R106A	本研究
pDR67 P _{spac} - <i>motPS</i> -P_E107A	pDR67+P _{spac} - <i>motPS</i> -P_E107A	本研究
pDR67 P _{spac} - <i>motPS</i> -P_E107Q	pDR67+P _{spac} - <i>motPS</i> -P_E107Q	本研究
pDR67 P _{spac} - <i>motPS</i> -P_D110A	pDR67+P _{spac} - <i>motPS</i> -P_D110A	本研究
pDR67 P _{spac} - <i>motPS</i> -P_D110N	pDR67+P _{spac} - <i>motPS</i> -P_D110N	本研究
pDR67 P _{spac} - <i>motPS</i> -P_D110K	pDR67+P _{spac} - <i>motPS</i> -P_D110K	本研究

2. 使用培地と試薬の組成

LB 培地(g/L)⁽⁴¹⁾

Tryptone	10 g
Yeast extract	5 g
NaCl	10 g

溶解後、オートクレーブで 121℃、20 分間の滅菌を行った。

SOB 培地(g/L)⁽⁴¹⁾

Tryptone	20 g
Yeast extract	5 g
NaCl	0.6 g
KCl	0.2 g

溶解後、オートクレーブで 121℃、20 分間の滅菌を行った。放冷後、別滅菌した 2 M マグネシウム溶液(1 M MgCl₂、1 M MgSO₄)を 10 ml 添加し、混合した。

SOC 培地(g/L)⁽⁴¹⁾

SOB 培地の組成に、2 M グルコースを 10 ml 添加し、混合した。

STET 溶液(g/L)⁽⁴¹⁾

Trizma-Base	6.06 g
EDTA	18.6 g
Sucrose	80 g
TritonX-100	50 ml

Trizma-Base を溶解後、6 N HCl で pH 8.0 に調整した。その後、上記の組成で試薬を混合し、オートクレーブで 121℃、20 分間の滅菌を行った。

Lysozyme 溶液(g/L)⁽⁴¹⁾

Lysozyme, from chicken Egg White	10 g
Trizma hydrochloride	1.57 g
50% Glycerol (v/v)	500 ml

RF1 培地(g/L) (コンピテントセル調製用)⁽⁴¹⁾

RbCl	12 g
MnCl ₂ ·4H ₂ O	9.9 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1.5 g
CH ₃ COOK	4.4 g
Glycerol	150 ml

0.2 M の酢酸で pH 5.8 に調整し、フィルター滅菌を行った。

RF2 培地(g/L) (コンピテントセル調製用)⁽⁴¹⁾

RbCl	1.2 g
CaCl ₂ · 2H ₂ O	14.9 g
MOPS	2.1 g
Glycerol	150 ml

0.2 M の酢酸で pH 6.8 に調整し、フィルター滅菌を行った。

10×Spizizen salt ・ 形質転換用(g/L)⁽⁴²⁾

KH ₂ PO ₄	60 g
K ₂ HPO ₄	140 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	20 g
Citrate·Na·2H ₂ O	10 g
MgSO ₄	1 g

溶解後、オートクレーブで 121℃、20 分間の滅菌を行った。

Spizizen I 培地(/100 ml)⁽⁴²⁾

10×Spizizen salt・形質転換用	10 ml
50% Glucose	1 ml
2% Casamino acids	1 ml
10% Yeast extract	1 ml
10 mg/ml Amino acids (Trp、Lys)	0.5 ml
dH ₂ O	90 ml

それぞれ別々にオートクレーブで 121℃、20 分間の滅菌を行った後、上記の組成で混合した。

Spizizen II 培地⁽⁴²⁾

Spizizen I 培地	100 ml
0.05 M CaCl ₂	1 ml
0.1 M MgCl ₂	2.5 ml

それぞれ別々にオートクレーブで 121℃、20 分間の滅菌を行った後、上記の組成で混合した。

TBAB 培地(g/L)⁽³⁷⁾

Trypsin	10 g
Beef extract	3 g
NaCl	5 g
agar	15 g

溶解後、オートクレーブで 121℃、20 分間の滅菌を行った。

10×Spizizen salt・運動解析用(g/L)⁽⁴²⁾

KH ₂ PO ₄	60 g
K ₂ HPO ₄	140 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	20 g
Citrate・H ₂ O	11 g
MgSO ₄ ・7H ₂ O	1 g

溶解後、オートクレーブで 121℃、20 分間の滅菌を行った。

Spizizen salt では通常、Citrate・Na・2H₂O を使用する。運動解析用は、枯草菌の運動性への Na⁺の影響を排除するために Citrate・H₂O を使用した。

0.25%軟寒天培地(/ 200 ml)⁽⁴²⁾

10×Spizizen salt・運動解析用	20 ml
1 M Glucose	5 ml
2% Casamino acids	2 ml
10% Yeast extract	2 ml
10 mg/ml Amino acids (Trp、Lys)	1 ml
dH ₂ O	170 ml
Noble agar (Difco)	0.5 g

それぞれ別々にオートクレーブで 121℃、20 分間の滅菌を行った。寒天は dH₂O に混合した後、オートクレーブで 121℃、20 分間の滅菌を行った。滅菌後、寒天が含まれている dH₂O に上記の組成で試薬を混合した。

0.25%軟寒天培地は、運動性試験を行うにあたり－80℃に保存していた菌株を一度遊泳させるために用いた。

0.25%軟寒天培地(pH 7.0)(/ 200 ml)⁽⁴²⁾

10×Spizizen salt・運動解析用	20 ml
1 M Glucose	5 ml
2% Casamino acids	2 ml
10% Yeast extract	2 ml
10 mg/ml Amino acids (Trp、Lys)	1 ml
4 M KOH	1 ml
dH ₂ O	170 ml
Noble agar (Difco)	0.5 g

それぞれ別々にオートクレーブで 121℃、20 分間の滅菌を行った。寒天は dH₂O に混合した後、オートクレーブで 121℃、20 分間の滅菌を行った。滅菌後、寒天が含まれている dH₂O に上記の組成で試薬を混合した。

0.25%軟寒天培地(pH 7.0)は運動性試験に用いた。

Spizizen I 培地(pH 7.0) (/200 ml)⁽⁴²⁾

10×Spizizen salt・運動解析用	20 ml
1 M Glucose	5 ml
2% Casamino acids	2 ml
10% Yeast extract	2 ml
10 mg/ml Amino acids (Trp、Lys)	1 ml
4 M KOH	1 ml
dH ₂ O	170 ml

それぞれ別々にオートクレーブで 121℃、20 分間の滅菌を行った後、上記の組成で混合した。

0.1 M PMSF(g/L) (タンパク質抽出液試薬)⁽⁴³⁾

PMSF	17.4 g
------	--------

2 - プロパノールに溶解した。

0.1 M NaOH(g/L) (Lowry 法試薬)⁽⁴³⁾

NaOH	4 g
------	-----

2% Na₂CO₃(g/L) (Lowry 法試薬)⁽⁴³⁾

Na ₂ CO ₃	20 g
---------------------------------	------

0.1 M NaOH 溶液に溶解した。

0.5% CuSO₄・5H₂O(g/L) (Lowry 法試薬)⁽⁴³⁾

CuSO ₄ ・5H ₂ O	5 g
--------------------------------------	-----

1% クエン酸ソーダ(g/L) (Lowry 法試薬)⁽⁴³⁾

Citrate・Na・2H ₂ O	1 g
------------------------------	-----

0.05 M Tris-HCl(pH 8.0) (g/L)⁽⁴³⁾

Trizma-Base	6.1 g
-------------	-------

6 N HCl で pH を 8.0 に調整をした。

10×TG Buffer(g/L)⁽⁴³⁾

Trizma-Base	30 g
グリシン	144 g

10×TBS Buffer(g/L)⁽⁴³⁾

Trizma-Base	24 g
NaCl	292.2 g

6 N HCl で pH 7.5 に調整した。

タンパク質抽出液⁽⁴³⁾

100 mM PMSF	500 µl
DNase I	600 ng
Complete, EDTA-free(Roche)	2 錠
50 mM Tris-HCl(pH 8.0)	50 ml

Complete, EDTA-free(Roche)は、プロテアーゼ阻害剤として混合した。

Lowry 試薬⁽⁴³⁾

2% Na ₂ CO ₃	50 ml
0.5% CuSO ₄ · 5H ₂ O	1 ml
1% クエン酸ソーダ	1 ml

2×サンプル Buffer(10 ml)⁽⁴³⁾

0.5 M Tris-HCl(pH 6.8)	2.5 ml
2-メルカプトエタノール	1 ml
20% SDS(w/v)	2 ml
スクロース	1 g
BPB	1 mg

BPB:ブロモフェノールブルー(Bromophenol blue)

TGM Buffer⁽⁴³⁾

10×TG Buffer	100 ml
メタノール	200 ml
dH ₂ O	700 ml

10×TG Buffer に dH₂O を加えたのち、メタノールを加えた。

TBS Buffer⁽⁴³⁾

10×TBS Buffer	100 ml
dH ₂ O	900 ml

TTBS Buffer⁽⁴³⁾

TBS Buffer	999 ml
Tween20	1 ml

10% (w/v) ブロッキング溶液⁽⁴³⁾

TTBS Buffer	50 ml
スキムミルク(ナカライテスク)	5 g

保存が出来ないので、要時調製を行った。

一次抗体溶液の場合、10%(w/v)ブロッキング溶液に抗 **MotA** ポリクローナル抗体または抗 **MotP** ポリクローナル抗体を約 3,000 倍希釈になるように添加した。二次抗体溶液の場合、5%(w/v)ブロッキング溶液にヤギ抗ウサギ **IgG-HRP conjugated (Bio-Rad)**を約 5,000 倍希釈になるように添加した。

ウェスタンブロット解析用化学発光検出薬

ECL Western Blotting Detection Kit (GE ヘルスケアジャパン)

第2項 実験手法

1. 変異導入箇所の選定

枯草菌の野生株である BR151MA 株は 168 株の派生株であるので、168 株のゲノム情報が掲載されている Subtilist(<http://hioinfo.hkn.hk/SubtiList/>)を利用し、固定子のアミノ酸配列を取得した。次に NCBI Blast(protein sequence Blast) (<http://www.ncbi.nih.gov/>)を利用し、他の細菌の MotA サブユニットのアミノ酸配列を取得した。取得した MotA サブユニットまたは MotP サブユニットのアミノ酸配列の詳細は表 2-3 または表 2-4 にまとめた。これらを用いて ClustalW(<http://align.genome.jp/>)でのアライメント解析を行った。その結果から変異を導入するアミノ酸残基を選定した。

表 2-3. MotA サブユニットのアライメントに使用した菌種とアクセス番号の一覧

菌種	Accession number
<i>Bacillus clausii</i>	YP_175479
<i>Bacillus cereus</i>	ZP_04205226
<i>Bacillus licheniformis</i>	YP_078709
<i>Bacillus subtilis</i>	NP_389252
<i>Escherichia coli</i>	YP_002329532
<i>Oceanobacillus iheyensis</i>	NP_693466
<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium	NP_460880

表 2-4. MotP サブユニットのアライメントに使用した菌種とサブユニット名とアクセス番号の一覧

菌種	サブユニット名	Accession number
<i>Bacillus halodurans</i>	MotP	NP_244106
<i>Bacillus pseudofirmus</i>	MotP	AAB_94399
<i>Oceanobacillus iheyensis</i>	MotP	NP_693146
<i>Bacillus megaterium</i>	MotP	P_46826
<i>Bacillus subtilis</i>	MotP	NP_390851
<i>Vibrio alginolyticus</i>	PomA	BAA_20284

2. 部位特異的変異導入固定子遺伝子 *motAB* と *motPS* のクローニング

固定子遺伝子に対して部位特異的変異導入を PCR 反応で行うための鋳型となるプラスミドを作製した。pMW-*motAB*⁽³⁸⁾または pMW-*motPS*⁽³⁸⁾を制限酵素 *Bam*HI-HF (New England Biolabs)で切断した。このとき、ベクターとして用いる pGEM7(+) (Promega)も同様に制限酵素 *Bam*HI-HF (New England Biolabs)で切断した。制限酵素反応は、説明書に準じて行った。各 DNA 断片を PCR purification kit (QIAGEN)により精製後、Quick Ligation kit (New England Biolabs)を用いて、説明書に準じて DNA 断片の連結を行った。次に、塩化ルビジウム法⁽⁴¹⁾によって製作した DH5α MCR のコンピテントセルに各反応液を添加し、形質転換を行った。形質転換を行った細胞を最終濃度が 100 µg/ml になるようにアンピシリンを添加した S-Gal/LB Agar Blend (SIGMA)に塗布し、37°Cで一晩静置培養を行った。得られたコロニーから Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega)を用いてプラスミドを回収した。取得したプラスミドを pGEM-AB または pGEM-PS とした。

選定した荷電アミノ酸残基に置換変異を導入するために pGEM-AB または pGEM-PS を Gene Tailor 変異導入システム kit (Invitrogen)の説明書に準じてメチル化を行った。次に置換変異を導入するために、メチル化した pGEM-AB または pGEM-PS を鋳型として PCR 反応を行った。今回 PCR 反応に使用したプライマーは表 2-5 にまとめた。PCR 反応の酵素は pGEM-AB には Accu Prime Taq high Fidelity Polymerase (Invitrogen)、pGEM-PS には Vent DNA polymerase (New England Biolabs)を用いた。PCR 反応は説明書に準じて行った。サーマルサイクラーは、日本バイオラッドラボラトリー社の i cycler を使用した。得られた PCR 産物を、PCR purification kit (QIAGEN)を用いて精製した。操作はキットに添付されているプロトコールに準じて行った。次に、得られた PCR 産物をあら

はじめ塩化ルビジウム法⁽⁴¹⁾によって製作した DH5 α -T1^R のコンピテントセルに添加し、形質転換を行った。形質転換を行った細胞を LB Amp¹⁰⁰ 培地に塗布し、37°Cで一晩静置培養を行った。得られたコロニーから Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega)を用いてプラスミドを回収し、制限酵素を用いて切断した。操作は説明書に準じて行った。このとき、ベクターとして用いる pDR67 も同様の制限酵素で切断した。制限酵素反応は、説明書に準じて行った。各 DNA 断片を PCR purification kit (QIAGEN)により精製後、Quick Ligation kit (New England Biolabs)を用いて、説明書に準じて DNA 断片の連結を行った。次に、塩化ルビジウム法⁽⁴¹⁾によって製作した DH5 α MCR のコンピテントセルに各反応液を添加し、形質転換を行った。得られたコロニーから Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega)を用いてプラスミドを回収した。回収したプラスミドに目的以外変異がないことをシーケンス解析により確認した。

3. 野生型固定子遺伝子 *motAB* と *motPS* のクローニング

枯草菌の H⁺駆動型固定子 MotAB と Na⁺駆動型固定子 MotPS を単独で発現した株を作製するために固定子遺伝子 *motAB* と *motPS* のクローニングを行った。pGEM-AB または pGEM-PS を鋳型として PCR 反応を行った。今回 PCR 反応に使用したプライマーは表 2-5 にまとめた。PCR 反応の酵素は Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs)を用いた。PCR 反応は説明書に準じて行った。サーマルサイクラーは、日本バイオラッドラボラトリー社の i cycler を使用した。得られた PCR 産物を、PCR purification kit (QIAGEN)を用いて精製した。各遺伝子をクローニングするために制限酵素で切断した。このとき、ベクターとして用いる pDR67 と pAX01 も同様の制限酵素で切断した。制

限酵素反応は、説明書に準じて行った。各 DNA 断片を PCR purification kit (QIAGEN)により精製後、Quick Ligation kit (New England Biolabs)を用いて、説明書に準じて DNA 断片の連結を行った。次に、塩化ルビジウム法⁽²⁷⁾によって製作した DH5 α MCR のコンピテントセルに各反応液を添加し、形質転換を行った。得られたコロニーから Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega)を用いてプラスミドを回収した。回収したプラスミドに目的以外変異がないことをシーケンス解析により確認した。

表2-5. PCR反応に使用したプライマーのヌクレオチド配列

Primer	sequence(5'→3')	Accession number and corresponding sequence
BSMotA-E84A	aactcattcctatgttctctgCatgggctcagct	M77238(1069-1102)
BAMotA-E84Q	aactcattcctatgttctctCAatgggctcagct	M77238(1069-1102)
BSMotA-E84-R	agagaacataggaatgagttcctctattgt	<u>M77238(1059-1088)</u>
BSMotA-R90A	ctgaatgggctcagcttgcaGCGcgcaaggctc	M77238(1087-1119)
BSMotA-R90E	ctgaatgggctcagcttgcaGAGcgcaaggctc	M77238(1087-1119)
BSMotA-R90-R	tgcaagctgagccattcagagaacatagg	<u>M77238(1077-1106)</u>
BSMotA-R91A	aatgggctcagcttgacgcGCgaaggtctgct	M77238(1090-1123)
BSMotA-R91-R	gcgtgcaagctgagccattcagagaacat	<u>M77238(1080-1109)</u>
BSMotA-E92A	gggctcagcttgacgccgcgCaggtctgcttgc	M77238(1093-1126)
BSMotA-E92Q	gggctcagcttgacgccgcCAaggtctgcttgc	M77238(1093-1126)
BSMotA-E92K	gggctcagcttgacgccgcAAAaggtctgcttgc	M77238(1093-1126)
BSMotA-E92-R	gcggcgtgcaagctgagccattcagagaa	<u>M77238(1083-1112)</u>
BSMotA-E98A	gcgaaggtctgcttgcttagCagcaagcattg	M77238(1111-1143)
BSMotA-E98Q	gcgaaggtctgcttgcttCaagcaagcattg	M77238(1111-1143)
BSMotA-E98-R	taaagcaagcagaccttcgggcggtgcaag	<u>M77238(1101-1130)</u>
BSMotA-E102A	ttgctttagaagcaagcattgCCgatgtagatga	M77238(1123-1156)
BSMotA-E102Q	ttgctttagaagcaagcattCaAgatgtagatga	M77238(1123-1156)
BSMotA-E102-R	aatgcttgcttctaagcaagcagaccttc	<u>M77238(1113-1142)</u>
BSMotA-D103A	ctttagaagcaagcattgaggCtgtagatgatgc	M77238(1126-1159)
BSMotA-D103N	ctttagaagcaagcattgagAatgtagatgatgc	M77238(1126-1159)
BSMotA-D103-R	ctcaatgcttgcttctaagcaagcagacc	<u>M77238(1116-1145)</u>
BSMotA-D105A	aagcaagcattgaggatgtagCtgatgcttctt	M77238(1132-1165)
BSMotA-D105N	aagcaagcattgaggatgtaAatgatgcttctt	M77238(1132-1165)
BSMotA-D105-R	tacatcctcaatgcttgcttctaagcaag	<u>M77238(1122-1151)</u>
BSMotA-D106A	caagcattgaggatgtagatCtgctttcttgaa	M77238(1135-1168)
BSMotA-D106N	caagcattgaggatgtagatAatgctttcttgaa	M77238(1135-1168)
BSMotA-D106-R	atctacatcctcaatgcttgcttctaagcaag	<u>M77238(1125-1154)</u>

変異導入箇所を大文字で示した。マイナス鎖のプライマーは Accession number に下線で示した。

表 2-5. PCR 反応に使用したプライマーのヌクレオチド配列 (続き)

Primer	sequence(5'→3')	Accession number and corresponding sequence
BSMotP-D91A	aaacctttgtttccctttccgCACacgcgcgaaa	L17309(281-314)
BSMotP-D91N	aaacctttgtttccctttccAACcacgcgcgaaa	L17309(281-314)
BSMotP-D91K	aaacctttgtttccctttccAAAcacgcgcgaaa	L17309(281-314)
BSMotP-D91-R	ggaaagggaacaaaggttttcacaagatc	<u>L17309(271-300)</u>
BSMotP-R94A	gtttccctttccgatcacgcgGCAaaacacgggctt	L17309(289-324)
BSMotP-R94E	gtttccctttccgatcacgcgGAAaaacacgggc	L17309(289-324)
BSMotP-R94-R	cgcgtgatcggaaagggaacaaaggtttt	<u>L17309(280-309)</u>
BSMotP-K95A	ccctttccgatcacgcgcgaGCacacgggctttt	L17309(293-329)
BSMotP-K95-R	tcgcgcgtgatcggaaagggaacaaaggt	<u>L17309(283-312)</u>
BSMotP-D102A	aaacacgggcttttatcattgGCTgatcaggctc	L17309(313-346)
BSMotP-D102N	aacacgggcttttatcattgAACgatcaggctcg	L17309(313-346)
BSMotP-D102K	aaacacgggcttttatcattgAAAgatcaggctc	L17309(313-346)
BSMotP-D102-R	caatgataaaagcccgtgttttcgcgcgtg	<u>L17309(304-333)</u>
BSMotP-D103A	acgggcttttatcattggatgCtcaggctcggga	L17309(317-350)
BSMotP-D103N	acgggcttttatcattggatAACcaggctcggga	L17309(317-350)
BSMotP-D103-R	atccaatgataaaagcccgtgttttcgcgc	<u>L17309(307-336)</u>
BSMotP-R106A	tatcattggatgatcaggctGCggaatcaaaga	L17309(326-359)
BSMotP-R106-R	agcctgatcatccaatgataaaagcccgtg	<u>L17309(316-345)</u>
BSMotP-E107A	tcattggatgatcaggctcgggCAAtcaaagatcc	L17309(329-362)
BSMotP-E107Q	cattggatgatcaggctcggCaGatcaaagcrcc	L17309(329-362)
BSMotP-E107-R	gggcttttatcattggatgatcaggctcggg	<u>L17309(319-349)</u>
BSMotP-D110A	atcaggctcgggaaatcaaagCtcattcttgaa	L17309(338-371)
BSMotP-D110N	atcaggctcgggaaatcaaaAaCccattcttgaa	L17309(338-371)
BSMotP-D110K	atcaggctcgggaaatcaaaAAAccattcttgaa	L17309(338-371)
BSMotP-D110-R	ttgatttcccagcctgatcatccaatga	<u>L17309(328-356)</u>

変異導入箇所を大文字で示した。マイナス鎖のプライマーは Accession number に下線で示した。

表 2-5. PCR 反応に使用したプライマーのヌクレオチド配列 (続き)

Primer	sequence(5'→3')	Accession number and corresponding sequence
B.S motAB BamHI(F)	cctaaagttccg GGAtc aaaaccg	M77238(770-794)
B.S motPS BamHI(F)	cgacatatgatatc GGatCC gttgcgatg	AF008220 (134834-134862)
B.S motAB XmaI	cctaaagt CcCGg Gcaccaaaacc	M77238(771-795)
B.S motPS XmaI	gaataaaga CCCGgg tgaagagcatatcg	AF008220(134943-134971)
B.S motAB-sac2-R	ggtagagatgt CcgCGG aatg	<u>M77238(2495-2516)</u>
B.S motPS-sac2-R	gcattatc CGcgG tacgttctgaac	<u>AF008220(136585-136609)</u>

変異導入箇所を大文字、制限酵素部位は赤字で示した。マイナス鎖のプライマーは Accession number に下線で示した。

4. 枯草菌変異導入株の取得

枯草菌の形質転換は、Spizizen 培地を用いたコンピテントセル作製法および形質転換法に準じて行った。宿主には枯草菌の固定子を欠損させた株 ($\Delta AB\Delta PS$) を使用し、作製したプラスミドを形質転換した。得られた形質転換体は pDR67 シリーズ(図 2-1)の場合は LB Cm⁵ 培地、pAX01 シリーズは LB Erm^I 培地に塗布し、37℃で一晩培養した。次に pDR67 シリーズから得られたコロニーを 0.5%の可溶性デンプンを含む LB 培地に植菌し、デンプン分解能の有無を確認し、デンプン分解能を失った株を選択した。pAX01 シリーズ(図 2-2)から得られたコロニーは S-Gal / LB Agar Blend (SIGMA)に最終濃度 1 µg / ml になるようにエリスロマイシンを添加した培地に植菌し、白色コロニーを形成する株を選択した。

5. 枯草菌変異株の軟寒天培地上での運動性試験

各菌株を適当な抗生物質を含む LB 培地に植菌し、単コロニー分離した。分離したコロニーを 0.25%軟寒天培地に植菌し、30℃で 16 時間培養した。その後、コロニーの外側を、TBAB 培地に植菌し、30℃で一晩静置培養し、単コロニー分離を行った。分離したコロニーを 0.25%軟寒天培地(pH 7.0)に爪楊枝を用いて植菌し、30℃で 16 時間静置培養した。ノギスを用いて 16 時間後のコロニーの直径を計測した。なお、計測は独立した最低 3 回の実験を行い、得られた結果の平均値から評価した。

6. 枯草菌変異株の液体培地中の運動性試験

各菌株を適当な抗生物質を含む LB 培地に植菌し、単コロニー分離した。分離したコロニーを 0.25%軟寒天培地に植菌し、30℃で 16 時間培養した。その

後、コロニーの外側を、TBAB 培地に植菌し、30℃で一晩静置培養し、単コロニー分離を行った。分離したコロニーを 2 ml の Spizizen I 培地(pH 7.0)に植菌し、30℃、200 rpm で一晩培養した。50 ml の Spizizen I 培地(pH 7.0)に培養液が 1%になるように植菌し、30℃、200 rpm で約 6 時間($OD_{600} \approx 0.5$)培養した。その後、暗視野顕微鏡(Leica DMLB100)で観察し、動画を保存した。保存した動画を 2D movement measurement capture 2D-PTV software (Digimo)を用いて 1 秒当たりの遊泳速度を算出した。なお、解析は独立した最低 3 回の実験を行い、計 90 細胞以上の遊泳速度を測定し、得られた結果の平均値から評価した。

7. ウェスタンブロット解析

枯草菌変異株の固定子の膜画分への発現量を検討するために、抗 MotA および抗 MotP ポリクローナル抗体を用いてウェスタンブロット解析を行った。各菌株を 2 ml の Spizizen I 培地(pH 7.0)に植菌し、30℃、200 rpm で一晩培養を行った。200 ml の Spizizen I 培地(pH 7.0)に培養液が 1%になるように植菌し、30℃、200 rpm で培養を行った。OD₆₀₀ が 1.5 に達した後、9,000 rpm、4℃で 20 分間遠心分離を行った。その後、上清を取り除き、ペレットを 50 ml の 0.05 M Tris-HCl(pH 8.0)の緩衝液に懸濁し、10 秒程ブレンダー (Labo Milser LM-PLUS, 大阪ケミカル社)で処理することでべん毛繊維を剪断し、9,000 rpm、4℃で 20 分間遠心分離を行った。上清を取り除いた後、再び 50 ml の 0.05 M Tris-HCl(pH 8.0)に懸濁し、9,000 rpm、4℃で 20 分間遠心分離を行った。その後、20 ml のタンパク質抽出液でペレットを懸濁した。懸濁液を高圧連続ホモジェナイザー (EmulsiFlex-C3, AVESTIN 社)を用いて 18,000 psi の圧力により細胞破碎を行った。細胞破碎後、8,000 rpm、4℃で 20 分間遠心分離を行った。遠心分離後、上清を Beckman Ti 74 ローターで 40,000 rpm、4℃で 90 分間遠心分離を行い、ペ

レットを 200 μ l の 0.05 M Tris-HCl(pH 8.0)に懸濁し、ホモジェナイザーを用いて溶解した。Lowry 法⁽⁴³⁾により、タンパク質の定量を行った。

次に、Criterion™ TGX™10%プレキャストポリアクリルアミドゲル (Bio-Rad)を用いて、電気泳動を行った。各サンプル 30 μ g 分を 2×サンプル Buffer に溶解して用いた。泳動の電圧は、100 V で行った。なお、分子量マーカは Precision Plus Protein Standard Dual color (Bio-Rad)を 5 μ l 使用した。

次に、電気泳動後のゲルからタンパクをニトロセルロースメンブレン (Bio-Rad)に転写する作業を行った⁽⁴³⁾。スポンジ 2 枚と厚紙 2 枚を冷えた TGM Buffer に浸しておいた。通電方向がマイナスからプラスなるように、マイナス側からスポンジ、厚紙、ゲル、ニトロセルロースメンブレン、厚紙、スポンジの順に空気が入らないように組み立てた。冷やした TGM Buffer でタンク内を満たし、15 V で 12 時間転写を行った。

最後に、免疫学的検出法により膜画分における MotA サブユニットまたは MotP サブユニットタンパク質の検出を行った⁽⁴³⁾。プラスチック容器に転写したメンブレンを入れ、イオン交換水で洗浄し、ボンソーS 溶液 (Novagen)を 10 ml 入れ、1 分間振盪し、軽くイオン交換水で洗浄後、染色結果をスキャナーで画像として保存した。その後、10%(w/v)ブロッキング溶液を 50 ml 程加え 2 時間振盪した。2 時間後、TTBS Buffer で 30 分間洗浄し、一度イオン交換水で洗った後、さらに TTBS Buffer で 5 分間洗浄した。一次抗体溶液(3,000 倍希釈した抗 MotA ポリクローナル抗体または抗 MotP ポリクローナル抗体)を 50 ml 加え 2 時間反応させた。2 時間後、TTBS Buffer で 30 分間洗浄し一度イオン交換水で洗浄し、さらに TTBS Buffer で 5 分間洗浄した。次に二次抗体溶液(3,000 倍希釈したヤギ抗ウサギ IgG-HRP conjugated (Bio-Rad))を 50 ml 加えて 1 時間反応させた。1 時間後、TTBS Buffer で 15 分間 2 回洗浄した。さらに、TBS Buffre で 5 分間 2 回

洗浄した。その後、ウエスタンブロット解析用化学発光検出薬である ECL Western Blotting Detection Kit (GE ヘルスケアジャパン)を 1 ml 用いてメンブレン上で 1 分間反応させた。検出器として ChemiDoc XRS Plus(Bio-Rad)を使用し、露光時間を 120 秒で画像を取得した。なお、PC アプリケーションとして QuantityOne (Bio-Rad)を使用した。検出した目的タンパク質の化学発光シグナルを検出し、シグナルの発光強度、体積から発現量を算出した。

8. キシロース誘導固定子発現株における運動性と固定子発現量の関係性

運動性と固定子の発現量の関係性を検討するためにキシロース誘導プロモーターの下流に固定子遺伝子を導入した株Pxyl-AB、Pxyl-PSを作製した。作製したPxyl-AB、Pxyl-PSを用いて、キシロースを0.05%、0.1%、0.5%、1%、2%、3%、4%になるように添加した0.25%軟寒天培地(pH 7.0)の運動性試験と Spizizen I 培地(pH 7.0)を用いたウエスタンブロット解析による膜画分における固定子の発現量を検討した。

9. 野生型の運動性上の変異型MotAB複合体または変異型MotPS複合体におけるドミナント-ネガティブ効果

部位特異的変異導入を行ったMotAサブユニットまたはMotPサブユニットがべん毛モーター基体に取り込まれているか観察するために、野生型固定子が発現している株(pAX-MotABまたはpAX-MotPS)にIPTG(isopropyl- β -D-thiogalactoside)誘導プロモーターの下流に変異型固定子遺伝子を導入したP_{spac}-MotAシリーズまたはP_{spac}-MotPシリーズを作製した。作製したP_{spac}-MotAシリーズまたはP_{spac}-MotPシリーズを用いて、最終濃度0.6 mMのIPTGが含まれる0.25%軟寒天培地(pH 7.0)での運動性を検討した。また、本実験において野生型固定子

が発現している株にIPTG誘導プロモーターの下流に野生型固定子を導入した $P_{\text{spac}}\text{-AB-WT}$ と $P_{\text{spac}}\text{-PS-WT}$ を比較対象として用いた。

10. 変異型固定子の強発現株における運動性試験と固定子の発現量の検討

部位特異的変異導入を行った変異型固定子を強発現させたことによる運動性や固定子の発現量への影響を検討するために宿主には枯草菌の固定子を欠損させた株($\Delta\text{AB}\Delta\text{PS}$)を使用し、IPTG誘導プロモーターの下流に変異型固定子遺伝子を導入したMotA-IシリーズまたはMotP-Iシリーズを作製した。作製したMotA-IシリーズまたはMotP-Iシリーズを用いて、最終濃度0.6 mMのIPTGが含まれる0.25%軟寒天培地(pH 7.0)での運動性を検討した。また、本実験においてIPTG誘導プロモーターの下流に野生型固定子を導入したAB-IとPS-Iを比較対象として用いた。

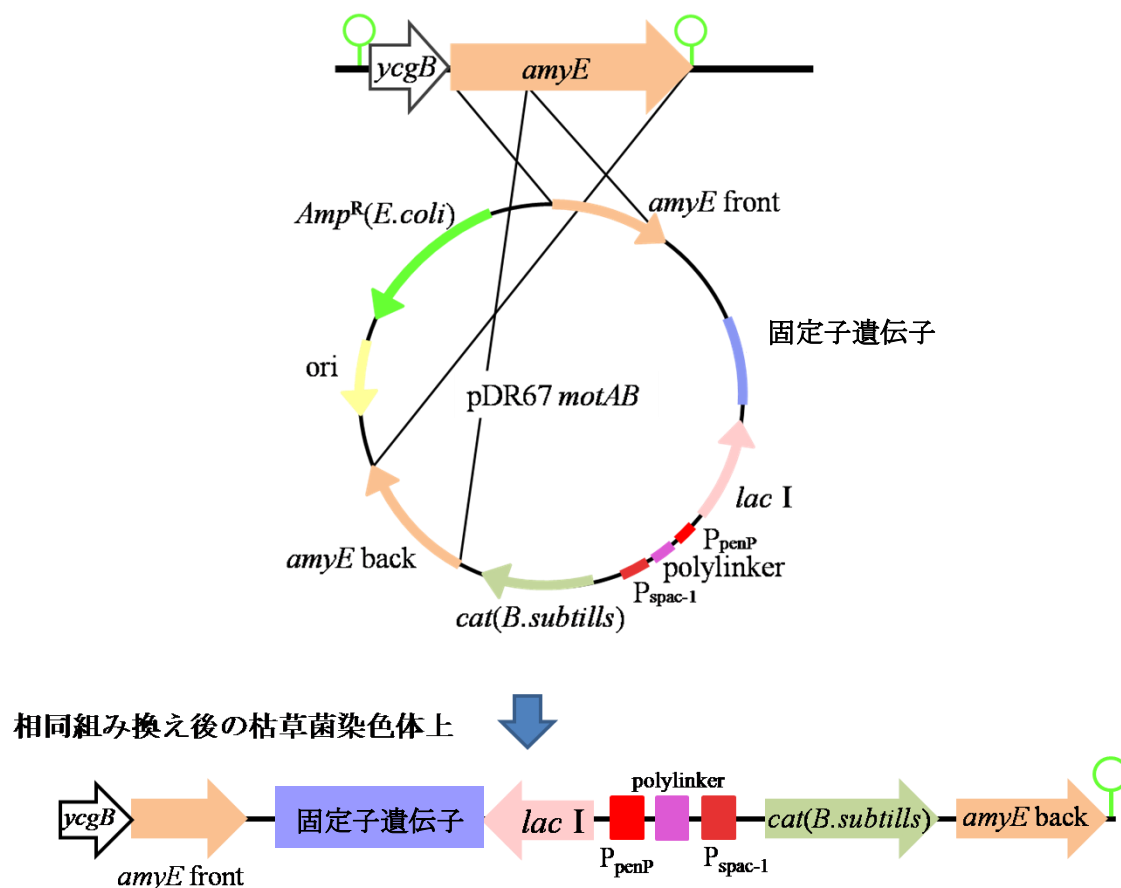


図 2-1. *amyE* 領域による枯草菌染色体上への相同組み換え模式図

ycgB: 枯草菌機能未同定遺伝子、*amyE*: α -アミラーゼをコードする遺伝子、*Amp^R (E. coli)*: 大腸菌で機能するアンピシリン耐性遺伝子、*ori*: 大腸菌複製開始点、*cat (B. subtilis)*: 枯草菌で機能するクロラムフェニコール耐性遺伝子、*P_{spac-1}*: IPTG 誘導プロモーター、polylinker: マルチクローニングサイト、*P_{penP}*: ペニシリナーゼ誘導プロモーター、*lacI*: *lac* リプレッサーをコードする遺伝子

枯草菌内に部位特異的変異導入を行った固定子遺伝子を発現させるために *amyE* 領域を持つ pDR67 を用いて染色体上に相同組み換えを行った。形質転換体は、*amyE* 領域に相同組み換えで組み込まれるため、菌体外アミラーゼ生産能が失われる。これを指標として目的の相同組み換え体を取得する。

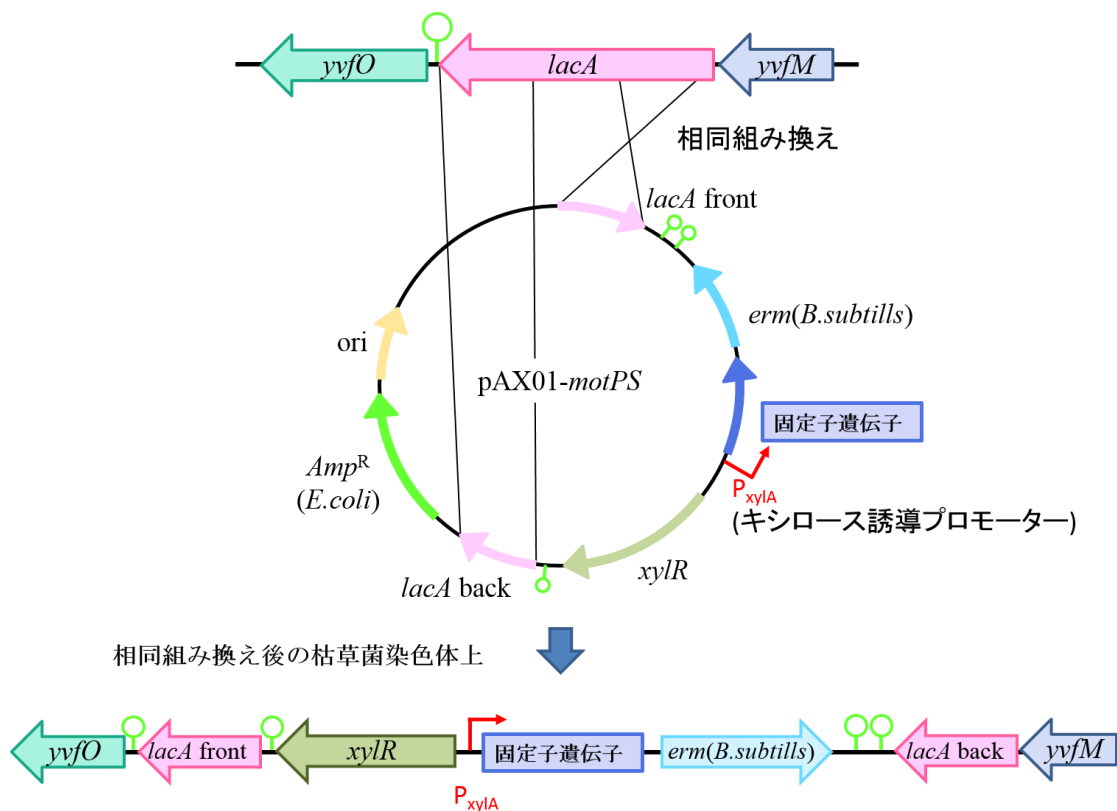


図 2-2. *lacA* 領域による枯草菌染色体上への相同組み換え模式図

yvfO: 枯草菌機能未知同定遺伝子、*yvfM*: 枯草菌機能未知同定遺伝子、*lacA*: ガラクトシドアセチルトランスフェラーゼをコードする遺伝子、*Amp^R(E. coli)*: 大腸菌で機能するアンピシリン耐性遺伝子、*ori*: 大腸菌複製開始点、*xylR*: キシロースプロモーターの転写抑制遺伝子、*P_{xylA}*: キシロース誘導プロモーター、*erm(B. subtilis)*: 枯草菌で機能するエリスロマイシン耐性遺伝子

枯草菌内に部位特異的変異導入を行った固定子遺伝子を発現させるために *lacA* 領域を持つ pAX01 を用いて染色体上に相同組み換えを行った。形質転換体は、*lacA* 領域に相同組み換えで組み込まれるため、ラクトースオペロンが機能しなくなることから β -ガラクトシダーゼ生産能が失われる。これを指標として目的の相同組み換え体を取得する。

第三節 結果

1. 変異導入箇所を選定

大腸菌べん毛モーターにおけるこれまでの研究から、 H^+ 駆動型固定子 MotAB の MotA サブユニットの 2 番目と 3 番目の膜貫通領域の間の細胞質ループ内に存在する 90 番目のアルギニン残基と 98 番目のグルタミン酸残基が運動性に重要であり、回転子構成タンパク質 FliG の C 末端領域の荷電アミノ酸残基と静電的相互作用により駆動力が発生すると提唱されている⁽¹⁰⁾。また、固定子の MotA の R90 と E98 は他の細菌の固定子間においても高度に保存されている(図 2-3、図 2-5)。

本研究では、枯草菌が持つ異なる 2 種類の固定子 H^+ 駆動型 MotA サブユニットと Na^+ 駆動型 MotP サブユニットの細胞質ループ内にある荷電アミノ酸残基が運動性に寄与しているのか検討するためにまず変異箇所を選定を行った。枯草菌と大腸菌、*Bacillus clausii*、*Bacillus cereus*、*Bacillus licheniformis*、*Oceanobacillus iheyensis*、*Salmonella enterica* serovar Typhimurium の MotA サブユニットのアミノ酸配列を用いて配列比較を行った(図 2-3)。その結果、枯草菌の MotA サブユニットでは R90 と E98 が高度に保存されていた(図 2-3)。枯草菌と *Bacillus halodurans*、*Bacillus pseudofirmus*、*Oceanobacillus iheyensis*、*Bacillus megaterium* の MotP サブユニットと *Vibrio alginolyticus* の PomA サブユニットのアミノ酸配列を用いて配列比較を行った(図 2-5)。その結果、枯草菌の MotP サブユニットでは R94 が高度に保存されていた。また、D102 は他の細菌ではグルタミン酸残基が高度に保存されていたが荷電アミノ酸残基の電荷という点ではマイナスの電荷が保存されていた(図 2-5)。これより、枯草菌が持つ 2 種類の固定子においても荷電アミノ酸残基が保存されていた(図 2-3、図 2-5)。

保存されている荷電アミノ酸残基とその周囲に存在している荷電アミノ酸残基がモーターの駆動力の発生に関与している可能性が推察されるので、変異箇所として選定した。選定した全ての変異箇所をアラニン残基に置換した株を構築した。その他に、アスパラギン酸残基やグルタミン酸残基の変異箇所に対してはアミノ酸の側鎖の長さを保つようにアスパラギン残基またはグルタミン残基に置換した変異株を構築した。運動性に重要な荷電アミノ酸残基の場合、逆の電荷を持つ荷電アミノ酸残基に置換した変異株の運動性は欠損することが報告されている^(28,29)。そのため、構築した変異株の運動性に顕著な影響が見られた変異箇所においては逆の電荷を持つ荷電アミノ酸残基に置換した変異株を構築した。

MotA サブユニットは、9 か所の荷電アミノ酸残基(E84、R90、R91、E92、E98、E102、D103、D105、D106)(図 2-4)に 18 種の変異株を構築した。また、MotP サブユニットは、8 か所の荷電アミノ酸残基(D91、R94、K95、D102、D103、R106、E107、D110)(図 2-5)に 17 種の変異株を構築した。

H⁺-driven type stator

			R90	E98		
BSMotA	83	SEWAQLAR	REGLLALE	EASIEDVDD	-----	AFLKNG 112
BLMotA	83	SEWAQIAR	REGLLALE	ANLNEIDD	-----	EFLKNG 112
OIMotA	83	SDWADQT	RKEGILSLE	QQISEVDD	-----	SFLSSG 112
BCMotA	83	VHWTSES	RKYGILSLE	QQLDKIQD	-----	EFLLRG 112
BCIMotA	85	VEYATIS	RRDGMLALE	SKIEDIDD	-----	PFFQQA 114
ECMotA	83	YRLMAKS	RQMGMFSLE	RDIENTPRESE	IFASYPRILADSV	MLEFIVDY 129
STMotA	83	YRLMAKS	RQQGMFSLE	RDIENTPKESE	IFASYPRILADAV	MLDFIVDY 129
			:*: *:***	.:.. :		*:

図 2-3. MotA サブユニットの 2 番目と 3 番目の膜貫通領域の間の細胞質内ループの変異導入箇所近傍のアミノ酸配列アライメント結果

BCI : *Bacillus clausii*、BC : *Bacillus cereus*、BL : *Bacillus licheniformis*、

BS : *Bacillus subtilis*、EC : *Escherichia coli*、OI : *Oceanobacillus iheyensis*、

ST : *Salmonella enterica* serovar Typhimurium

枯草菌と他の細菌の MotA サブユニットのアミノ酸配列の比較により、2 番目と 3 番目の膜貫通領域の間の細胞内ループ領域に比較的保存性が高く静電的相互作用に重要と考えられる荷電アミノ酸残基 90 番目のアルギニン残基(R90)、98 番目のグルタミン酸残基(E98)を黒く塗りつぶし、白字で示した。また、変異導入箇所は文字を紫で示した。

MotA サブユニット

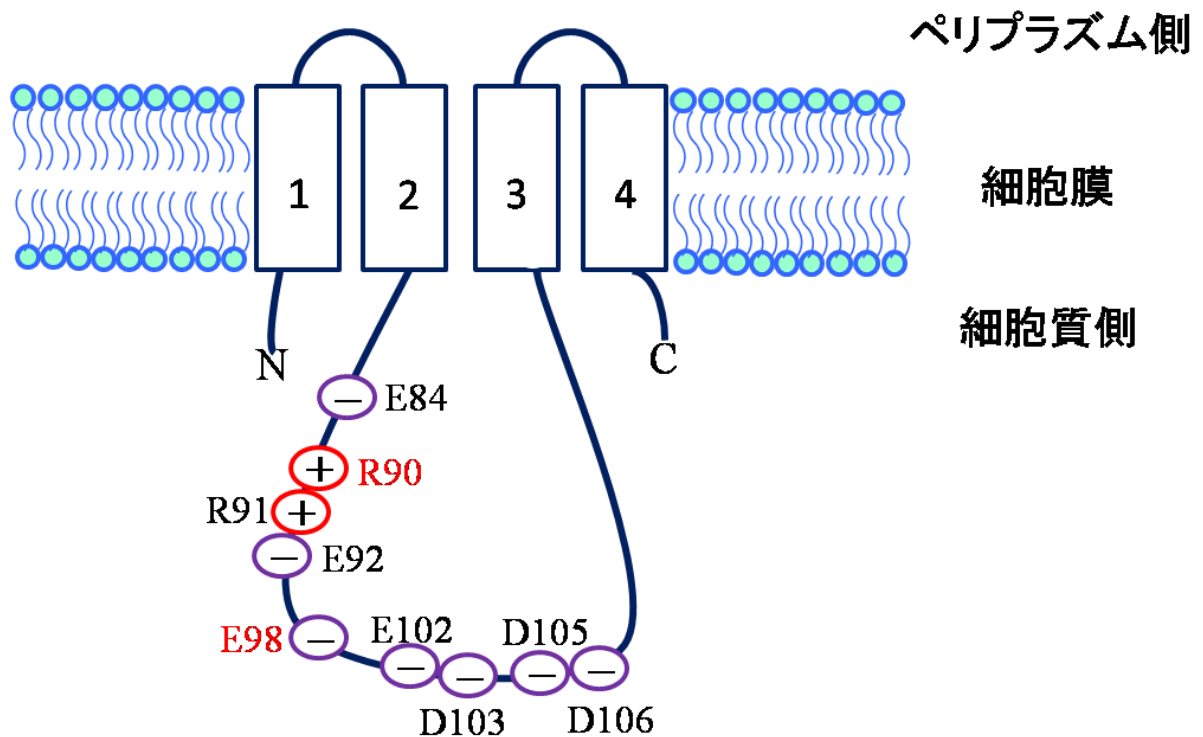


図 2-4. 枯草菌の MotA サブユニットにおける変異導入荷電アミノ酸残基部位

H⁺駆動型固定子構成タンパク質 MotA の 2 番目と 3 番目の膜貫通領域の間に存在する細胞質内ループにある荷電アミノ酸残基を選定し、変異導入箇所を決定した。赤字で示した 90 番目のアルギニン残基(R90)と 98 番目のグルタミン酸残基(E98)は荷電アミノ酸残基の中ではもっとも保存性が高かった。四角内の数字は、N 末端側からの膜貫通領域の順番を示した。

Na⁺-driven type stator

			R94	D102		
BSMotP	85	TFVSLSDHARKHGLLSLDDQAREIKDPFLKKGLLLAIDGWDEET				128
BHMotP	85	TFVNLSGKARRREGLLALEAGLDEEVEDPFIRKGILLAVDGI EPDV				128
BPMotP	85	TFVDLSGKARRREGLLALEVG-LEDVRDPFIKKGVLAVDGI EPDV				129
OiMotP	85	LFIHLSDRARRREGILALENE-LDEVEDPFIRKGMLAVDGV EPEV				128
BMMotP	85	TFVHLSEKARRREGLLSLEAE-LEQIDDSFVKKGILL AIDGVEPEM				128
VAPomA	79	KIVEMADAARKGGFLALEEM---EINNTFMQKGIDLLVDGHDADV				120
		:: :: **:: **::**::			:: :: .*::**:: *::**:: ::	

図 2-5. MotP サブユニットの 2 番目と 3 番目の膜貫通領域の間の細胞質内ループの変異導入箇所近傍のアミノ酸配列アライメント結果

BH : *Bacillus halodurans*、BP : *Bacillus pseudofirmus*、Oi : *Oceanobacillus*

ihenyensis、BM : *Bacillus megaterium*、BS : *Bacillus subtilis*、VA : *Vibrio*

alginolyticus、

枯草菌の MotP サブユニットと他の細菌の固定子サブユニットのアミノ酸配列の比較により、2 番目と 3 番目の膜貫通領域の間の細胞内ループ領域に比較的保存性が高く静電的相互作用に重要と考えられる荷電アミノ酸残基 94 番目のアルギニン残基(R94)と、電荷が保存されていた 102 番目のアスパラギン酸残基(D102)を黒く塗りつぶし、白字で示した。また、変異導入箇所は文字を紫で示した。

MotP サブユニット

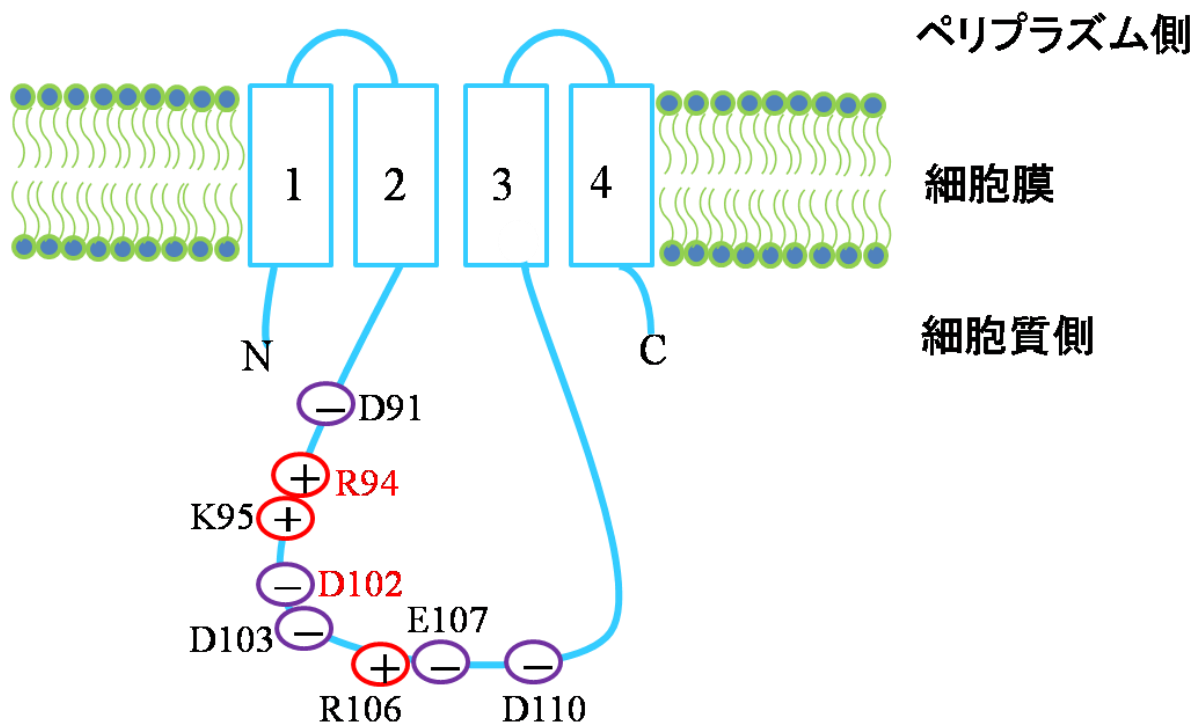


図 2-6. 枯草菌の MotP サブユニットにおける変異導入荷電アミノ酸残基部位

Na⁺駆動型固定子構成タンパク質 MotP の 2 番目と 3 番目の膜貫通領域の間に存在する細胞質内ループにある荷電アミノ酸残基を選定し、変異導入箇所を決定した。保存性がもっと高かった 94 番目のアルギニン残基(R94)を赤字で示した。また、電荷が保存されていた 102 番目のアスパラギン酸残基(D102)も同様に赤字で示した。四角内の数字は、N 末端側からの膜貫通領域の順番を示した。

2. 変異型 MotA サブユニットと MotP サブユニットが発現した変異株の軟寒天培地上での運動性試験

構築した部位特異的変異株の運動性を軟寒天培地(pH 7.0)で調べた(表 2-6)。大腸菌の MotA サブユニットの運動性に重要な R90 をアラニン残基に置換した変異株の運動性は 37℃で野生型の 50%を示した⁽²⁹⁾。Zhou らの研究から、運動性が野生株の 50%以下に低下した変異株を運動性に影響があると判断した。

MotA 変異株では、MotA-R90A、MotA-R90E、MotA-E92Q、MotA-E92K で運動性を確認できなかった。この荷電アミノ酸以外にも、98 番目のグルタミン酸残基や 102 番目のグルタミン酸残基の変異株は野生株 BS-AB と運動性を比較すると MotA-E98A が 34%、MotA-E102A が 45%、MotA-E102Q が 43%に運動性が低下していた(表 2-6A)。

MotP 変異株では、MotP-D102A と MotP-D110N で運動性を確認できなかった。また、保存性の高い 94 番目のアルギニン残基の変異株は野生株 BS-PS と運動性を比較すると MotP-R94A が 33%、MotP-R94E が 11%に運動性が低下していた。それ以外の荷電アミノ酸残基の変異体も野生型 MotPS 株と運動性を比較すると MotP-D91K が 18%、MotP-K95A が 38%、MotP-D102K が 31%まで運動性が低下していた。110 番目のアスパラギン酸残基をアスパラギン残基に置換した MotP-D110N で運動性を観察できなかった。この結果から、逆の荷電を持つリジン残基に置換した MotP-D110K を構築した。しかし、MotP-D110K における運動性は野生型 MotPS 株の 72%の運動性であった。91 番目のアスパラギン酸残基では、今回示した 30℃で行った運動性試験では運動性への影響が小さい。しかし、37℃で運動性試験を行うと MotP-D91A は BS-PS の 25%まで運動性が低下したことから逆の電荷を持つリジン残基に置換した MotP-D91K を構築した(表 2-6B)。

MotA サブユニットと MotP サブユニットの細胞質ループ内の荷電アミノ酸残基における部位特異的変異株の運動性試験の結果、MotA サブユニットでは R90、E98 と E102、MotP サブユニットでは D91、R94、K95、D102 が運動性に寄与している荷電アミノ酸残基であると示唆された。

MotA サブユニットの 92 番目のグルタミン酸残基で構築した変異体の運動性試験では、MotA-E92Q や MotA-E92K で運動性に影響が見られた。しかし、MotA-E92A は BS-AB の 81%の運動性を保持していた。これらの結果から、MotA サブユニットの 92 番目のグルタミン酸残基の電荷が運動性に重要でないことが示唆された。また、MotP サブユニットの 110 番目のアスパラギン酸残基は、逆の荷電アミノ酸残基に置換した MotP-D110K は BS-PS の 72%の運動性を保持していた。この結果から、MotP サブユニットの 110 番目のアスパラギン酸残基を置換した変異体の運動性への影響はアミノ酸残基の側鎖の長さが影響しているためで、電荷が重要でないことが示唆された。

3. 変異型 MotA サブユニットと MotP サブユニットが発現した変異株の

液体培地中での遊泳解析

構築した部位特異的変異株の液体培地中(SpizizenI 培地(pH 7.0))での遊泳速度を解析した(表 2-6)。野生型である BS-AB の遊泳速度は $17.4 \pm 3.3 \mu\text{m/s}$ 、BS-PS の遊泳速度は、30℃の時に $1.3 \pm 0.3 \mu\text{m/s}$ 、37℃の時に $2.1 \pm 0.4 \mu\text{m/s}$ であった。MotA 変異株では、MotA-R90A、MotA-R90E、MotA-E92Q、MotA-E92K で遊泳を観察することができなかった。また、BS-AB と比較して MotA-E98A は 41%、MotA-E98Q は 51%、MotA-E102A は 55%、MotA-E102Q は 57%まで遊泳速度が低下していた。MotP 変異株では、MotP-D91K、MotP-R94E、MotP-D102A、MotP-D110N で遊泳を観察することができなかった。また、BS-PS と比較して MotP-

R94A は 29%、MotP-K95A は 31%、MotP-D102K は 38%、MotP-E107A は 46%まで遊泳速度が低下していた。遊泳が観察できなかった変異株や遊泳速度の低下が観察された変異株のほとんどは軟寒天培地上での運動性と相関性が見られた。

4. ウェスタンブロット法による変異型 MotA サブユニットと MotP サブユニットの膜画分における発現量の検討

運動性試験を変異体で行った結果、運動性の低下が見られた変異体はいくつか見られた(表 2-6)。しかし、変異体での運動性の低下が固定子の発現量によることが推察された。そのため、ウェスタンブロット法を用いて膜画分における MotA サブユニットまたは MotP サブユニットの発現量の検討を行った。

野生株と変異株の MotA サブユニットにおける発現量を検討した結果、MotA-E92Q で MotA サブユニットのシグナルを検出することが出来なかった。また、MotA-R90A、MotA-R90E、MotA-E92A、MotA-E102A、MotA-D106A の MotA の発現量は野生株と比較してそれぞれ、7.0%、8.0%、8.0%、22%、48%まで低下していた(図 2-7)。

野生株と変異株の MotP サブユニットにおける発現量を検討した結果、MotP-D102A と MotP-D110N で MotP サブユニットのシグナルを検出することが出来なかった。また、MotP-D91A、MotP-D91K、MotP-R94A、MotP-D102K の MotP の発現量は野生株と比較してそれぞれ、8.0%、5.0%、25%、41%まで低下していた(図 2-8)。

これらの変異体の MotA または MotP の発現量が低下した要因は、変異によって固定子が不安定化して安定的に膜に発現出来なくなったためではないかと推察した。

ウェスタンブロット法による MotA サブユニットまたは MotP サブユニット

の発現量の検討結果と変異株における運動性試験の結果を比較すると、運動性の欠損または顕著な低下が見られた MotA サブユニットの MotA-R90A、MotA-R90E、MotA-E92Q、MotA-E92K、MotP サブユニットの MotP-D91K、MotP-D102A、MotP-D110N 株は固定子の発現量の低下が運動性に影響を与えていると推定した。これらの変異株の結果とは逆に、MotA サブユニットの MotA-E102Q、MotP サブユニットの MotP-K95A と MotP-E107A の運動性は野生型と比較すると約 50%程度に低下していた (図 2-7、図 2-8)。しかし、固定子の発現量は野生型と比較すると MotA サブユニットの MotA-E102Q で 77%、MotP サブユニットの MotP-K95A で 101%、MotP-E107A で 78%まで発現量を保持していた。これらの結果から、MotA サブユニットの E102、MotP サブユニットの K95 と E107 が運動性に重要な役割を果たしている荷電アミノ酸残基であることが可能性が示唆された。

今回、構築した変異株における運動性試験と膜画分における MotA または MotP の発現量の検討を行った結果、一部の変異株を除いて固定子の発現量と運動性の相関性が見られた。これらの変異体の結果は、一定量の固定子が発現していれば運動性を保持できるのではないかと考えられた。しかし、MotA サブユニットの MotA-E92A、MotP サブユニットの MotP-D91A は膜画分での発現量が顕著に低下しているにも関わらず、運動性を保持していた。そのため、固定子の発現量と運動性の関係性を検証することとした。

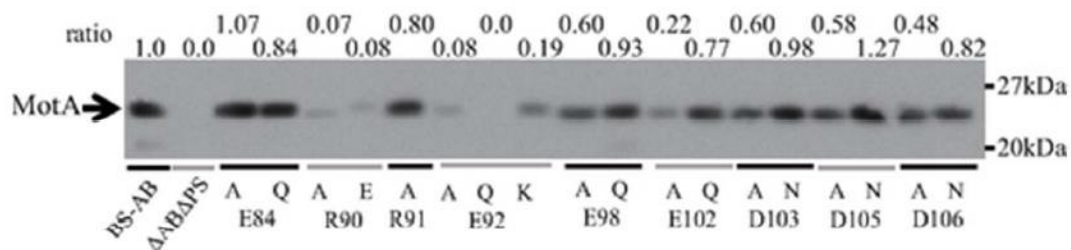


図 2-7. 抗 MotA 抗体を用いた膜画分における MotA 検出の結果

抗 MotA ポリクローナル抗体を用いて検出した。サンプルは 30 μ g 泳動した。各レーンにサンプル名とシグナルの発現割合を記した。

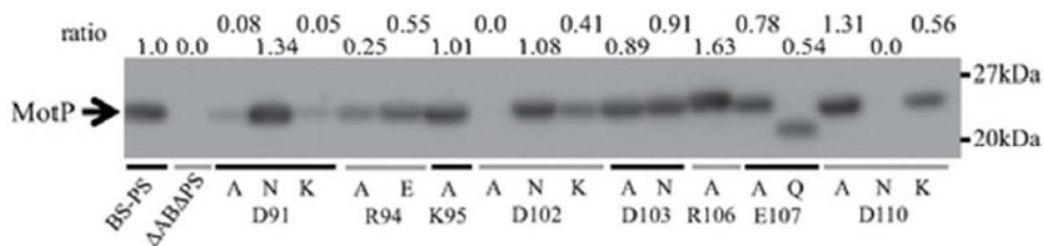


図 2-8. 抗 MotP 抗体を用いた膜画分における MotP 検出結果

抗 MotP ポリクローナル抗体を用いて検出した。サンプルは 30 μ g 泳動した。各レーンにサンプル名とシグナルの発現割合を記した。

5. キシロース誘導固定子発現株における運動性と固定子発現量の関係性

運動性と固定子の発現量の関係性を検討するためにキシロース誘導プロモーターの下流に固定子遺伝子を導入した株 Pxyl-AB、Pxyl-PS を構築した。構築したキシロース誘導固定子発現株と、*motAB* プロモーターで固定子を発現する BS-AB 株または BS-PS 株を野生株として運動性と固定子の発現量の関係性を検討した (図 2-9)。

H⁺駆動型固定子 MotAB では、キシロース濃度を徐々に上昇させることにより運動性と固定子の発現量はキシロース濃度 1%まで直線的に増加していき運動性と固定子の発現量の相関性が見られた。しかし、キシロースを 2%添加した時に最大の発現量(161%)を示した。その後は、キシロース濃度が増加しても発現量は徐々に減少していった(図 2-9)。運動性は、キシロースを 1%以上添加しても変化しなかった(図 2-9)。以上のことから、H⁺駆動型固定子 MotAB は、野生型 MotAB の運動性を示すためには *motAB* プロモーターで発現した野生型 MotAB と同等の MotAB の発現量が必要であり、それ以上の MotAB の発現は運動性に影響しないと考えられた。

Na⁺駆動型固定子 MotPS でも MotAB 同様にキシロースを 1%まで徐々に添加していくと運動性、固定子の発現量共に直線的な増加が観察された。キシロースを 1%添加すると *motAB* プロモーターで発現した野生型 MotPS と比較して運動性は 89%、発現量は 93% とほぼ同様の値を示した(図 2-9)。MotPS においては、2%のキシロースを添加すると MotP の発現量は 78%、3%で 70%、4%まで添加すると 57%まで *motAB* プロモーターで発現した野生型 MotPS の発現量よりも減少していた。しかし、発現量が減少しているにも関わらず運動性は *motAB* プロモーターによって発現した野生型 MotPS と同様の運動性を示した。キシロース誘導プロモーターで発現させた MotPS がキシロースを 1%以上添加

すると MotPS の発現量が減少しているように観察された。その要因として、キシロース誘導による MotPS の高発現化による影響で細胞膜中に存在する MotPS が分解されてしまったためウエスタンブロット解析では観察できなかったのではないかと考えたが、ウエスタンブロット解析による結果では、MotPS の分解によって生成するであろう低分子のシグナルは観察されなかった。しかし、運動性を保持していることから運動性に十分な量の MotPS が発現していることが推察された。

キシロース誘導プロモーターを用いた固定子発現株のキシロース濃度による運動性と固定子の発現量の関係性を検討した結果、*motAB* プロモーターによって発現した野生型固定子と同等の運動性を示すまでは、固定子の発現量に運動性が依存しているという結果が得られた。しかし、MotA サブユニットの E92A と MotP サブユニットの D91A の運動性は固定子の発現量に依存していなかった。この要因として、ウエスタンブロット法による固定子の発現量の検討結果が固定子の発現量を過小評価しているためだと考えた。その為に、MotA サブユニットの E92A と MotP サブユニットの D91A の変異が導入されている固定子が機能しているか確認する必要がある。これを立証するために、*motAB* プロモーターで野生型固定子を発現させた株に IPTG 誘導プロモーターの下流に変異型固定子を導入した共発現株を構築した。構築した株を用いて変異型固定子の野生型固定子に対する優位性を調べるためにドミナント-ネガティブ効果の検証を行った。この他の変異体でも、変異型固定子が基部位に取り込まれ機能しているか確認するためにドミナント-ネガティブ効果の検証は有効であるので、同時に検証を行った。

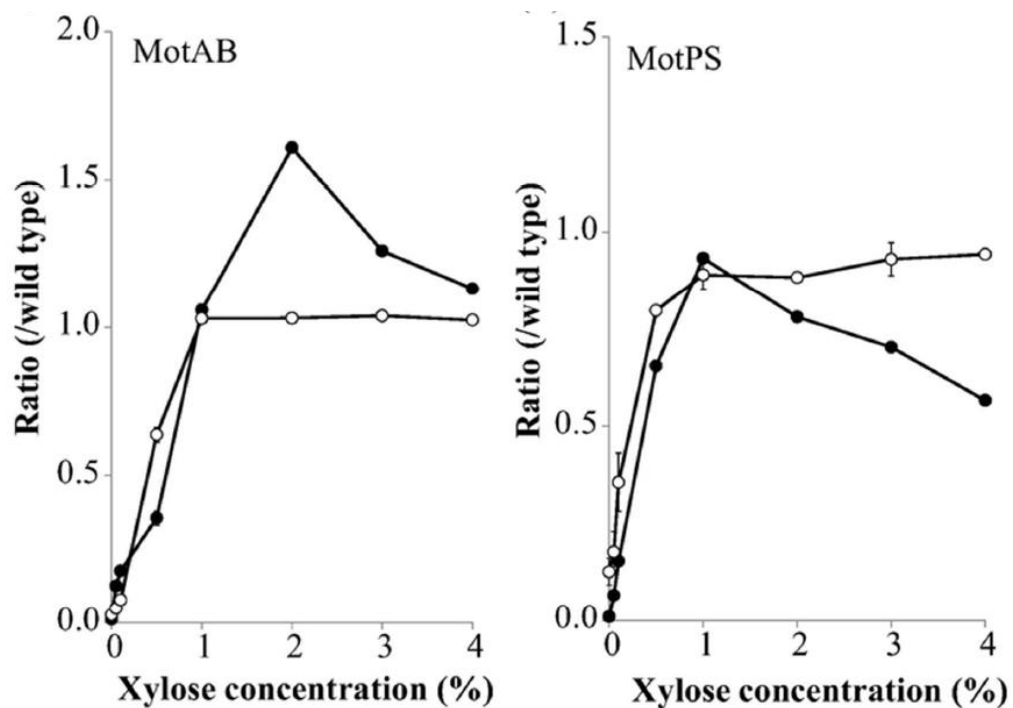


図 2-9. キシロース誘導固定子発現株の運動性と固定子発現量の比較

グラフの縦軸は野生型を 1 としたときの運動性と固定子の発現量の割合、横軸はキシロース濃度を示した。各グラフのシンボルの表記は次のとおりである。白丸(○)は軟寒天培地上での運動性の割合を、黒丸(●)はウエスタンブロット解析における固定子の発現量の割合を示す。キシロースは 0.05%、0.1%、0.5%、1%、2%、3%、4%の各濃度になるように培地中に添加した。

6. 野生型の運動性上の変異型 MotAB 複合体または変異型 MotPS 複合体におけるドミナント-ネガティブ効果

変異型固定子が基部体内に取り込まれ、機能しているのか観察するために野生型固定子が発現する株 (BS-la-AB または BS-la-PS)に変異型 MotA サブユニットまたは MotP サブユニットを IPTG 誘導プロモーターにより発現する株を構築し、運動性試験を行った。その結果、MotA サブユニットの MotA-E98A、MotA-E98Q、MotA-E102A、MotA-E102Q、MotP サブユニットの MotP-R94A、MotP-K95A、MotP-E107A は野生型の運動性よりも変異を単独で導入した変異株に近い運動性を示した(表 2-6)。これらの変異型固定子におけるドミナント - ネガティブ効果を観察することができた。次に、発現量の顕著な低下が見られた MotA サブユニットの MotA-R90A、MotA-R90E、MotA-E92Q、MotA-E92K、MotP サブユニットの MotP-D102A、MotP-D102K、MotP-D110N は野生型と同様の運動性が観察されたことから、変異型固定子におけるドミナント - ネガティブ効果が観察されなかった(表 2-6)。

運動性が固定子の発現量に依存していなかった MotA サブユニットの MotA-E92A においてはドミナント-ネガティブ効果が観察できたことから基部体内に取り込まれていると結論づけた(表 2-6)。しかし、運動性が固定子の発現量に依存していなかった MotP サブユニットの MotP-D91A はドミナント-ネガティブ効果を観察することが出来なかった。MotP サブユニットの 91 番目のアスパラギン酸残基の変異体である MotP-D91A と MotP-D91N は 37℃で運動性試験を行うと 30℃の時よりも低い運動性を示した(表 2-6)。また、MotP-D91A の MotP サブユニットの発現量の検討を 37℃で行うと MotP サブユニットのシグナルを観察することができなかった。これらの結果から、MotP サブユニットの 91 番目のアスパラギン酸残基に変異を導入するとタンパク質の安定化が極端に低下

するのではないかと考えた。このため、変異株における運動性や固定子の発現量に温度感受性を示し、野生型との共発現株でドミナント-ネガティブ効果が観察出来ないと結論づけた。

表 2-6. 固定子変異体解析結果一覧

(A) MotA サブユニット

Strain		Category	Motility ratio (%) (30 °C)	swimming speed (%) (30 °C)	Membrane expression level (%)	Dominance
					MotA	
$\Delta AB\Delta PS$		Negative control	0.0 ± 0.0 (imm)	0.0 ± 0.0 (imm)	0.0 ± 0.0	1.0 ± 0.01
MotA strain						
Wild type		Positive control	100.0 ± 4.4	100.0 ± 3.3	100.0 ± 8.9	1.00 ± 0.09
E84	A	No effect	90.8 ± 7.3	77.0 ± 4.0	107 ± 5.0	0.91 ± 0.14
	Q	No effect	105.0 ± 3.0	99.3 ± 2.1	83.8 ± 9.6	1.05 ± 0.07
R90	A	Membrane level	0.0 ± 0.3 (imm)	0.0 ± 0.0 (imm)	7.3 ± 0.1	1.14 ± 0.01
	E	Membrane level	0.0 ± 0.6 (imm)	0.0 ± 0.0 (imm)	8.0 ± 1.1	0.92 ± 0.01
R91	A	No effect	85.2 ± 2.1	100.5 ± 3.1	80.4 ± 2.1	0.98 ± 0.04
E92	A	Membrane level	80.6 ± 4.0	100.7 ± 2.0	8.2 ± 0.7	0.80 ± 0.08
	Q	Membrane level	0.0 ± 0.6 (imm)	0.0 ± 0.0 (imm)	0.0 ± 0.0	0.92 ± 0.01
	K	Membrane level	0.0 ± 0.2 (imm)	0.0 ± 0.0 (imm)	18.8 ± 0.4	0.90 ± 0.01
E98	A	Function	33.6 ± 3.4	40.8 ± 2.5	59.5 ± 1.5	0.72 ± 0.07
	Q	Function	63.7 ± 2.3	51.1 ± 0.1	93.2 ± 5.0	0.79 ± 0.05
E102	A	Function	45.3 ± 5.7	54.5 ± 1.2	22.2 ± 2.1	0.67 ± 0.01
	Q	Function	42.8 ± 5.1	57.0 ± 5.7	77.2 ± 2.5	0.81 ± 0.10
D103	A	No effect	76.7 ± 6.2	70.7 ± 6.2	59.8 ± 6.0	0.96 ± 0.12
	N	No effect	87.2 ± 4.0	100.4 ± 0.4	98.1 ± 3.2	1.08 ± 0.08
D105	A	No effect	87.0 ± 1.7	69.8 ± 4.3	57.8 ± 1.3	0.96 ± 0.03
	N	No effect	81.4 ± 5.1	66.1 ± 1.9	126.6 ± 4.5	0.99 ± 0.10
D106	A	No effect	79.0 ± 3.9	76.1 ± 2.3	48.2 ± 3.6	0.89 ± 0.07
	N	No effect	87.8 ± 3.2	99.6 ± 0.9	82.2 ± 3.9	0.90 ± 0.06

(B-1) MotP サブユニット

Strain		Category	Motility ratio (%) (30 °C)	swimming speed (%) (30 °C)	Membrane expression level (%), 30 °C	Dominance
					MotP	
$\Delta AB\Delta PS$		Negative control	0.0 ± 0.0 (imm)	0.0 ± 0.0 (imm)	0.0 ± 0.0	1.0 ± 0.02
MotP strain						
Wild type		Positive control	100.0 ± 1.7	100.0 ± 26.9	100.0 ± 9.0	1.0 ± 0.08
D91	A	Membrane level	54.7 ± 2.0	59.2 ± 11.5	8.1 ± 1.1	1.55 ± 0.08
	N	No effect (30 °C), Membrane level (37 °C)	117.6 ± 8.6	115.38 ± 33.0	134.4 ± 0.6	1.13 ± 0.03
	K	Membrane level	18.1 ± 1.0	0.0 ± 0.0 (imm)	4.7 ± 3.3	1.07 ± 0.01
R94	A	Function	33.0 ± 5.8	28.5 ± 7.6	24.6 ± 1.9	0.48 ± 0.01
	E	Function	11.2 ± 2.1	0.0 ± 0.0 (imm)	54.9 ± 2.8	0.59 ± 0.04
K95	A	Function	38.0 ± 3.3	30.8 ± 9.2	100.9 ± 1.6	0.50 ± 0.06
D102	A	Membrane level	0.0 ± 0.5 (imm)	0.0 ± 0.0 (imm)	0.0 ± 0.0	1.33 ± 0.05
	N	No effect	96.3 ± 10.5	96.2 ± 30.7	108.2 ± 1.7	1.43 ± 0.14
	K	Function	30.7 ± 2.0	38.4 ± 8.0	40.5 ± 1.9	1.27 ± 0.08
D103	A	No effect	95.6 ± 5.7	92.3 ± 10.7	89.1 ± 7.3	1.01 ± 0.13
	N	No effect	80.7 ± 9.9	76.9 ± 16.2	90.8 ± 5.6	0.81 ± 0.03
R106	A	No effect	114.8 ± 5.1	138.5 ± 26.1	162.5 ± 6.2	1.10 ± 0.03
E107	A	Function	44.3 ± 4.4	46.2 ± 11.5	77.9 ± 2.9	0.66 ± 0.03
	Q	No effect	77.8 ± 4.0	84.6 ± 23.0	54.3 ± 3.2	0.80 ± 0.01
D110	A	No effect	94.1 ± 5.2	96.9 ± 15.4	130.6 ± 5.2	1.12 ± 0.02
	N	Membrane level	0.0 ± 0.4 (imm)	0.0 ± 0.0 (imm)	0.0 ± 0.0	0.96 ± 0.01
	K	No effect	71.7 ± 4.9	76.9 ± 13.1	56.1 ± 2.7	0.81 ± 0.02

(B-2) MotP サブユニット

Strain		Category	Motility ratio (%) (37 °C)	swimming speed (%) (37 °C)	Membrane expression level (%), 37 °C
					MotP
Δ AB Δ PS		Negative control	0.0 \pm 0.0 (imm)	0.0 \pm 0.0 (imm)	0.0 \pm 0.0
MotP strain					
Wildtype		Positive control	100.0 \pm 7.7	100.0 \pm 33.3	100.0 \pm 9.0
D91	A	Membrane level	24.8 \pm 0.5	0.0 \pm 0.0 (imm)	1.0 \pm 0.1
	N	No effect (30 °C), Membrane level (37 °C)	65.8 \pm 13.4	85.4 \pm 22.0	24.0 \pm 2.1
	K	Membrane level	20.2 \pm 3.0	0.0 \pm 0.0 (imm)	5.0 \pm 0.7

Category : Membrane level, 固定子構造の安定化 : Function, モーター機能へ関与

Motility ratio : 軟寒天培地上における運動性試験。(A)BS-AB、(B)BS-PS(野生型)を 100 とした時の割合。培養条件は、0.25%軟寒天培地(pH 7.0)で 30°C、16 時間静置培養した。変異株の運動性が BS-AB または BS-PS(野生型)の 50%以下の場合、黄色で示した。また、運動性を示さなかった場合、灰色で示した。

(imm) : 非運動性

Swimming speed : 液体培地中での遊泳速度。(A)BS-AB、(B)BS-PS(野生型)を 100 とした時の割合。変異株の遊泳速度が BS-AB または BS-PS(野生型)の 50%以下の場合、黄色で示した。また、運動性を示さなかった場合、灰色で示した。

Membrane expression level (A) 抗 MotA 抗体、(B)抗 MotP 抗体を用いたウエスタンブロット解析による MotA サブユニットまたは MotP サブユニットの発現量。(A)BS-AB、(B)BS-PS(野生型)を 100 とした時の割合。変異株の発現強度が BS-AB または BS-PS (野生型)の 50%以下の場合、オレンジ色で示した。また、シグナルが観察できなかった場合、濃灰色で示した。Dominance : 野生型固定子(A)MotAB、(B)MotPS の運動性に対する変異型固定子のドミナント-ネガティブ効果。野生型固定子発現株に IPTG 誘導発現固定子を発現させた株((A)P_{spac}-AB-WT、(B) P_{spac}-PS-WT)を 100 とした時の野生型固定子発現株に IPTG 誘導発現変異型固定子を発現させた株の運動性の割合。変異型固定子のドミナント-ネガティブ効果 81%以下の場合、水色で示した。

7. 変異型 MotAB 複合体または変異型 MotPS 複合体の強発現による運動性や固定子の発現量への影響

変異型固定子を強発現させたことによる運動性や固定子の発現量への影響を検討するために IPTG 誘導プロモーターの下流に変異型固定子遺伝子を導入した株を構築し、軟寒天培地上における運動性試験とウエスタンブロット法による膜画分における固定子の発現量の検討を行った。その結果、強発現固定子変異株の膜画分における固定子の発現量は野生型と同等もしくは減少していた(表 2-7、表 2-8)。しかし、全ての変異株において野生型の 65%以下に低下していないことから運動性への固定子の発現量は影響していないと考えられる。

運動性試験の結果、枯草菌の *motAB* のプロモーターを用いて固定子を発現させた株の場合と比較して MotA-E102 と MotP-E107 において作製した変異株以外では、ほぼ同様の割合の運動性を示した(表 2-7、表 2-8)。MotA-E102A や MotA-E102Q の運動性は、固定子を強発現させていない時は(表 2-6A)、それぞれ 45%、43%であったが、固定子を強発現させた時は 60%、108%であった。また、MotP-E107A や MotP-E107Q の運動性は、固定子を強発現させていない時は(表 2-6B)、それぞれ 44%、78%であったが、固定子を強発現させた時は 81%、91%であった。これらの結果は、MotA-E102 や MotP-E107 において作製した変異型固定子は強発現することで運動性を回復することを示唆していた。

表 2-7. H⁺駆動型 MotA 変異固定子を強発現した株の軟寒天運動性試験と固定子の発現量

MotA 変異株		IPTG 誘導	
		運動性(軟寒天) (%)	固定子発現量 (%)
Wild type MotAB		100	100
E84	A	91.4	72.5
	Q	104.7	105.2
R90	A	11.7	86.6
	E	4.4	86.3
R91	A	86.1	87.0
E92	A	88.6	73.3
	Q	7.1	87.6
	K	5.3	103.0
E98	A	37.4	109.2
	Q	65.8	113.7
E102	A	60.3	81.2
	Q	108.8	101.4
D103	A	78.0	75.6
	N	88.0	85.0
D105	A	87.8	70.8
	N	82.5	119.8
D106	A	80.2	68.9
	N	88.5	82.2

数値は、野生型である AB-I 株の運動性または固定子の発現量を 100 とした時の割合を示している。

表 2-8. Na⁺駆動型 MotP 変異固定子を強発現した株の軟寒天運動性試験と固定子の発現量

MotP 変異株		IPTG 誘導	
		運動性(軟寒天) (%)	固定子発現量 (%)
Wild type MotPS		100.0	100.0
D91	A	60.0	87.4
	N	115.6	114.8
	K	27.7	87.1
R94	A	40.8	97.4
	E	21.7	95.9
K95	A	45.3	103.9
D102	A	8.6	74.0
	N	96.7	110.1
	K	38.8	88.4
D103	A	96.1	83.9
	N	83.0	86.7
R106	A	113.1	158.3
E107	A	81.4	102.3
	Q	91.0	81.9
D110	A	94.8	113.1
	N	10.0	69.7
	K	75.0	87.1

数値は、野生型である PS-I 株の運動性または固定子の発現量を 100 とした時の割合を示している。

第四節 考察

本章では、枯草菌べん毛モーターH⁺駆動型固定子 MotAB および Na⁺駆動型固定子 MotPS に導入した変異に基づいて運動性に重要なアミノ酸残基の特定を行った。

MotA-E98 と MotP-R94 は他の細菌間においても固定子に高度に保存されていた。MotA-E98 と MotP-R94 の変異導入株の運動性試験やウエスタンブロット解析による固定子の発現量、ドミナント-ネガティブ効果における運動性の結果から MotA-E98 と MotP-R94 は、べん毛モーターの駆動力の発生に直接的に関与していることが示唆された。また、MotP-R94 は MotP サブユニットの安定性にも寄与していることが示唆された。MotP-K95A は運動性が BS-PS と比較して低下しているにもかかわらず、固定子の発現量は BS-PS と同様の数値を示した。また、MotP-K95 は、Na⁺駆動型固定子間において荷電アミノ酸残基の荷電が高度に保存されていた。これらのことから、MotP-K95 はモーターの回転において重要なアミノ酸残基であることが示唆された。

MotA-R90、MotA-E92、MotP-D91、MotP-D102 の変異体は、運動性の顕著な低下を引き起こした。この原因として、変異株の固定子の発現量の低下が考えられた。MotA-R90 は他の細菌間においても高度に保存されているが、MotA-R90A は、固定子の発現量の低下による運動性の低下を引き起こしている。このことから、MotA-R90 は MotAB の構造の安定化に寄与していることが示唆された。MotA-E92 の変異体は運動性の低下は引き起こさなかった。しかし、MotA-E92A、MotA-E92Q、MotA-E92K の MotA サブユニットの発現量が顕著に低下していることから、MotA-E92 は構造の安定化に重要であると推定した。MotP-D91 と MotP-D102 はアラニン残基またはリジン残基に置換した変異体の

運動性や MotP サブユニットの発現量は、置換変異の影響によって低下した。

これらの結果から、MotA-R90、MotA-E92、MotP-D91、MotP-D102 は固定子タンパク質の安定化に寄与している可能性が示唆された。

サルモネラ菌を用いた研究から、モーターの回転に重要であると考えられていた MotA サブユニットの 98 番目のグルタミン酸残基(E98)に対して構築した置換変異株は、アラビノース誘導プロモーターを用いて変異型固定子を強発現させることによって運動性を回復することが報告されている⁽³¹⁾。この結果は、MotA-E98 はモーターの回転に直接的に重要ではなく、固定子を基部体に取り込むために FliG の C 末端領域の荷電アミノ酸残基と静電的相互作用をしていることを示唆していた。本研究においても枯草菌の変異型固定子の強発現株を構築し、IPTG 誘導によって変異型固定子を強発現させた株の運動性への影響を検証した結果、MotA-E102 と MotP-E107 において構築した変異株において運動性の回復が観察された。この結果から、MotA-E102 と MotP-E107 は固定子が基部体に取り込まれるために重要な荷電アミノ酸残基であることが示唆された。

本研究から、枯草菌べん毛モーターの回転機構は、MotA サブユニットと MotP サブユニットの 2 番目と 3 番目の膜貫通領域間の荷電アミノ酸残基と回転子 FliG サブユニットの C 末端領域に保存された荷電アミノ酸残基間での静電的相互作用に依存している可能性が示唆された。モーターの回転に重要であると同定した荷電アミノ酸残基の電荷が、H⁺駆動型はマイナス(E98)、Na⁺駆動型はプラス(R94、K95)であった。このことから、1 つの回転子 FliG に対して 2 種類の固定子を持つ枯草菌のべん毛モーターは、H⁺駆動型と Na⁺駆動型で相互作用部位を区別している可能性が示唆された。

V. alginolyticus の Na⁺駆動型べん毛モーター固定子 PomAB の PomA サブユニ

ットと回転子構成タンパク質 **FliG** 間における静電的相互作用には **PomA** サブユニットと **FliG** の多くの荷電アミノ酸残基が必要となる。このことから、**MotA** サブユニットと **FliG** 間の静電的相互作用と比較して複雑であることが報告されている⁽³⁵⁾。一方、枯草菌の Na^+ 駆動型固定子 **MotPS** は回転子との静電的相互作用に多くの荷電アミノ酸残基を必要としていない。

今後、枯草菌の **FliG** の C 末端領域の運動性に重要な荷電アミノ酸残基の同定を行うことで、より詳細な回転子、固定子間の相互作用の解明が進むことが期待される。

第三章 枯草菌べん毛モーター固定子におけるイオン流入経路に関与するアミノ酸残基の特定と解析

第一節 諸言

これまでの研究から、大腸菌の H^+ 駆動型固定子 MotAB において MotB サブユニットの膜貫通領域の 32 番目のアスパラギン酸残基を他のアミノ酸残基に置換すると運動性が失われることが報告されている⁽¹³⁾。例外として、アスパラギン酸残基と同じ電荷を持つグルタミン酸残基に置換した変異体の場合、32°C の軟寒天培地上で運動性(野生型の 8%程度)を示す⁽¹³⁾。また、大腸菌の MotB サブユニットの膜貫通領域の 32 番目のアスパラギン酸残基は、これまで研究が行われている全ての固定子において同様の箇所では絶対に保存されている。これらの結果から、MotB サブユニットの 32 番目のアスパラギン酸残基は、運動性に重要な荷電アミノ酸残基であり、共役イオン結合部位であると提唱された⁽¹³⁾。

本研究の研究対象である枯草菌は、 H^+ 駆動型固定子 MotAB の MotB サブユニットの 24 番目(MotB-D24)、 Na^+ 駆動型固定子 MotPS の MotS サブユニットの 30 番目(MotS-D30)にアスパラギン酸残基が保存されている。しかし、枯草菌の固定子において保存されている MotB または MotS サブユニットのアスパラギン酸残基が大腸菌と同様に運動性に重要であるか解析は行われていない。また、固定子複合体の立体構造がいまだ明らかになっていないことから、イオン流入経路などイオン透過機構に詳細が明らかとなっていない。

当研究室の卒業生である古山によって、枯草菌べん毛モーター固定子 MotB

サブユニットまたは MotS サブユニットに保存されたアスパラギン酸残基をアラニン残基、アスパラギン残基、グルタミン酸残基に置換したアミノ酸置換変異株が取得された⁽⁵²⁾。また、アミノ酸置換変異株の運動性向上株の取得が行われた。その結果、グルタミン酸残基に置換した変異体(MotB-D24E、MotS-D30E)でのみ、自然突然変異による運動性向上株(MotB-D24Eup、MotS-D30Eup)が取得された。取得した運動性向上株において、*motAB* または *motPS* 遺伝子領域のシーケンス解析により変異箇所の同定を行った。その結果、MotB-D24Eup では、MotB サブユニットの 181 番目のスレオニン残基がアラニン残基に置換(act→gct)されていた。また、MotS-D30Eup では取得した株において MotP の 172 番目のロイシン残基がプロリン残基(ctg→ccg)に置換されていた⁽⁴⁴⁾。

本章では、枯草菌べん毛モーター固定子における推定イオン結合部位において構築した置換変異株とグルタミン酸残基に置換した置換変異株(MotB-D24E、MotS-D30E)から取得された自然突然変異による運動性向上株の詳細な解析を試みた。

第二節 実験材料と方法

第一項 実験材料

1. 使用菌株、使用プラスミド

本研究で使用した菌株を表 3-1 に、使用したプラスミドを表 3-2 に示した。大腸菌の培養には LB 培地を使用した。大腸菌形質転換体の培養には LB Amp¹⁰⁰ 培地を使用した。枯草菌の培養には LB 培地または Spizizen 培地を使用した。抗生物質は、Cm⁵ を添加した。軟寒天培地を用いた運動性試験には、Spizizen 培地に 0.25% の Noble Agar (Becton Dickinson 社) を加えた軟寒天培地を使用した。

表 3-1. 使用菌株

菌株	遺伝子型または説明	リファレンス
大腸菌(<i>Escherichia coli</i>)		
DH5α MCR	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ1 (<i>mrr-hsd RMS-mcrBC</i>) Φ80 <i>dlacZ</i> Δ(<i>lacZYAargF</i>) <i>U169 deoR recA1 endA1 supE44 λthi-1</i> <i>gyr-496 relA1</i>	Stratagene
枯草菌(<i>Bacillus subtilis</i>)		
BR151MA	<i>lys3 tripC2</i> (wild type)	(37)
ΔABΔPS	BR151MA Δ <i>motAB</i> Δ <i>motPS</i>	(44)
MotAB	ΔABΔPS <i>amyE::P_{motAB}-motAB</i>	(44)
MotPS	ΔABΔPS <i>amyE::P_{motAB}-motPS</i>	(44)
MotB-D24A	ΔABΔPS <i>amyE::P_{motAB}-motAB-MotB-D24A</i>	(44)
MotB-D24N	ΔABΔPS <i>amyE::P_{motAB}-motAB-MotB-D24N</i>	(44)
MotB-D24E	ΔABΔPS <i>amyE::P_{motAB}-motAB-MotB-D24E</i>	(44)
MotB-D24E-up	spontaneous up-motile variant from MotB-D24E	(44)
MotB-D24E/T181A	ΔABΔPS <i>amyE::P_{motAB}-motAB</i> (MotB-D24E, MotB-T181A)	(44)
MotB-T181A	ΔABΔPS <i>amyE::P_{motAB}-motAB-MotB-T181A</i>	本研究
MotS-D30A	ΔABΔPS <i>amyE::P_{motAB}-motPS-MotS-D30A</i>	(44)
MotS-D30N	ΔABΔPS <i>amyE::P_{motAB}-motPS-MotS-D30N</i>	(44)
MotS-D30E	ΔABΔPS <i>amyE::P_{motAB}-motPS-MotS-D30E</i>	(44)
MotS-D30E-up1	spontaneous up-motile variant from MotS-D30E	(44)
MotS-D30E-up2	spontaneous up-motile variant from MotS-D30E	(44)
MotS-D30E-up3	spontaneous up-motile variant from MotS-D30E	(44)
MotS-D30E-up4	spontaneous up-motile variant from MotS-D30E	(44)
MotP-L172P/MotS-D30E	ΔABΔPS <i>amyE::P_{motAB}-motPS</i> (MotP-L172P, MotS-D30E)	(44)
MotP-L172P	ΔABΔPS <i>amyE::P_{motAB}-motPS-MotP-L172P</i>	本研究

表 3-2. 使用プラスミド

プラスミド	説明	リファレンス
pDR67-motB-T181A	pDR67 + P _{motAB} - <i>motAB</i> - <i>motB</i> -T181A	(44)
pDR67-motP-L172P	pDR67 + P _{motAB} - <i>motPS</i> - <i>motP</i> -L172P	(44)

2. 使用培地と試薬の組成

TBAB 培地(g/L)

第二章 第二節 第一項参照

10×Spizizen salt・運動解析用

第二章 第二節 第一項参照

0.25%軟寒天培地(pH 7.0)

第二章 第二節 第一項参照

0.25%軟寒天培地(pH 8.0)(/ 200 ml)

10×Spizizen salt・運動解析用	20 ml
1 M Glucose	5 ml
2% Casamino acids	2 ml
10% Yeast extract	2 ml
10 mg/ml Amino acids (Trp、Lys)	1 ml
4 M KOH	3 ml
dH ₂ O	170 ml
Noble agar (Difco)	0.5 g

溶解後、別々にオートクレーブで 121℃、20 分間の滅菌を行った。寒天は dH₂O に混合した後にオートクレーブで 121℃、20 分間の滅菌を行った。滅菌後、寒天が含まれている dH₂O に上記の組成で試薬を混合した。

0.25%軟寒天培地(pH 8.0)は運動性試験に用いた。

0.25%軟寒天培地(pH 8.0、200 mM NaCl)(/ 200 ml)

10×Spizizen salt・運動解析用	20 ml
1 M Glucose	5 ml
2% Casamino acids	2 ml
10% Yeast extract	2 ml
10 mg/ml Amino acids (Trp、Lys)	1 ml
5 M NaCl	8 ml
4 M KOH	3 ml
dH ₂ O	160 ml
Noble agar (Difco)	0.5 g

溶解後、別々にオートクレーブで 121℃、20 分間の滅菌を行った。寒天は dH₂O に混合した後にオートクレーブで 121℃、20 分間の滅菌を行った。滅菌後、寒天が含まれている dH₂O に上記の組成で試薬を混合した。

0.25%軟寒天培地(pH 8.0、200 mM NaCl)は運動性試験に用いた。

Spizizen I 培地(pH 7.0)

第二章 第二節 第一項参照

Spizizen I 培地(pH 8.0)(/ 200 ml)

10×Spizizen salt・運動解析用	20 ml
1 M Glucose	5 ml
2% Casamino acids	2 ml
10% Yeast extract	2 ml
10 mg/ml Amino acids (Trp、Lys)	1 ml
4 M KOH	3 ml
dH ₂ O	170 ml

溶解後、別々にオートクレーブで 121℃、20 分間の滅菌を行った。滅菌後、dH₂O に上記の組成で試薬を混合した。

Spizizen I 培地(pH 8.0、200 mM NaCl)(/ 200 ml)

10×Spizizen salt・運動解析用	20 ml
1 M Glucose	5 ml
2% Casamino acids	2 ml
10% Yeast extract	2 ml
10 mg/ml Amino acids (Trp, Lys)	1 ml
5 M NaCl	8 ml
4 M KOH	3 ml
dH ₂ O	160 ml

溶解後、別々にオートクレーブで 121℃、20 分間の滅菌を行った。滅菌後、dH₂O に上記の組成で試薬を混合した。

0.1 M PMSF

第二章 第二節 第一項参照

0.1 M NaOH

第二章 第二節 第一項参照

2% Na₂CO₃(Lowry 法試薬)

第二章 第二節 第一項参照

0.5% CuSO₄・5H₂O(g/L)(Lowry 法試薬)

第二章 第二節 第一項参照

1% クエン酸ソーダ(g/L)(Lowry 法試薬)

第二章 第二節 第一項参照

0.05 M Tris-HCl(pH 8.0)

第二章 第二節 第一項参照

10×TG Buffer

第二章 第二節 第一項参照

10×TBS Buffer(g/L)⁽¹²⁾

第二章 第二節 第一項参照

タンパク質抽出液

第二章 第二節 第一項参照

Lowry 試薬⁽¹²⁾

第二章 第二節 第一項参照

2×サンプル Buffer

第二章 第二節 第一項参照

TGM Buffer

第二章 第二節 第一項参照

TTBS Buffer

第二章 第二節 第一項参照

10%(w/v)ブロッキング溶液

第二章 第二節 第一項参照

一次抗体溶液の場合、10%(w/v)ブロッキング溶液に抗 MotA ポリクローナル抗体は約 1,000 倍、抗 MotP ポリクローナル抗体、抗 MotS ポリクローナル抗体を約 3,000 倍希釈になるように添加した。

二次抗体の場合、5%(w/v)ブロッキング溶液にヤギ抗ウサギ IgG-HRP conjugated (Bio-Rad 社)を約 3,000 倍または約 5,000 倍になるように添加した。

ウエスタンブロット解析用化学発光検出薬

ECL Western Blotting Detection Kit (GE ヘルスケアジャパン)

第二項 実験手法

1. 枯草菌アミノ酸置換変異株の作製

枯草菌べん毛モーター固定子 H^+ 駆動型 MotB サブユニットの 181 番目のスレオニン残基をアラニン残基に、 Na^+ 駆動型 MotP サブユニットの 172 番目のロイシン残基をプロリン残基に置換した変異型 *motAB* または変異型 *motPS* 遺伝子断片を導入した pDR67 を枯草菌コンピテントセルに形質転換した。枯草菌の形質転換法は、第 2 章、第 2 節、第 2 項に準じた方法で行い、宿主は枯草菌固定子欠損株($\Delta AB\Delta PS$)を用いた。取得した株を MotB-T181A、MotP-L172P とした。

2. アミノ酸置換変異株の運動性試験

アミノ酸置換変異株の軟寒天培地上で運動性試験を行った。運動性試験の方法は第 2 章、第 2 節、第 2 項、に準じて行った。MotB シリーズは 0.25%軟寒天培地(pH 7.0)に植菌し、37°Cで 16 時間静置培養後の運動性を観察した。MotS シリーズは 0.25%軟寒天培地(pH 8.0)または、0.25%軟寒天培地(pH 8.0、200 mM NaCl)に植菌し、37°Cで 16 時間静置培養後の運動性を観察した。比較対象として、枯草菌において H^+ 駆動型固定子 MotAB または Na^+ 駆動型固定子 MotPS のみを発現させた株(MotAB、MotPS)と $\Delta AB\Delta PS$ を用いた。

3. 液体培地中の運動性試験

アミノ酸置換変異株の遊泳解析を行った。遊泳解析の方法は第 2 章、第 2 節、第 2 項、に準じて行った。MotB シリーズは、Spizizen I 培地(pH 7.0)を培地とし、MotS シリーズは、Spizizen I 培地(pH 8.0、200 mM NaCl)を培地として用いた。

4. べん毛染色

べん毛染色は、西沢・菅原法を改変した方法を用いて行った⁽⁵²⁾。変異株は、液体培地中の運動性解析と同様の条件で培養を行った。スライドガラスは、前日からエタノールで洗浄した。洗浄したスライドガラスをイオン交換水で洗浄し、自然乾燥させた。スライドガラス上で 9 μ l の滅菌水と適度に希釈した培養液 1 μ l を混合しスライドガラス上に広げ、自然乾燥させた。乾燥したサンプルに 20 μ l の染色液で 1 分間染色した。染色後、イオン交換水で洗浄し、直後に現像液を塗布した。現像液は塗布した直後に、イオン交換水で洗浄した。洗浄後、サンプルが乾燥する前に光学顕微鏡 (Leica DMLB100) で観察した。

5. ウェスタンブロット解析

アミノ酸置換変異株のウェスタンブロット解析による固定子タンパク質の膜画分における発現量の検討を行った。ウェスタンブロット解析の方法は第 2 章、第 2 節、第 2 項、に準じて行った。MotB シリーズは、Spizizen I 培地(pH 7.0)を培地とした、MotS シリーズは、Spizizen I 培地(pH 8.0、200 mM NaCl)を培地として用いた。検出方法として、化学蛍光発光法を用いた。ウェスタンブロット解析用化学発光検出薬である ECL Western Blotting Detection Kit (GE ヘルスケアジャパン) を 1 ml 用いてメンブレン上で 1 分間反応させた。検出器として ChemiDoc XRS Plus (Bio-Rad) を使用し、露光時間を 120 秒で画像を取得した。なお、PC アプリケーションとして QuantityOne (Bio-Rad) を使用した。検出した目的タンパク質の化学発光シグナルを検出し、シグナルの発光強度、体積から発現量を算出した。

第三節 結果

1. アミノ酸残基置換変異株における軟寒天培地上での運動性試験

これまでの研究から、大腸菌の H^+ 駆動型固定子 MotAB において MotB サブユニットの膜貫通領域の 32 番目のアスパラギン酸残基は、運動性に重要な荷電アミノ酸残基であり、共役イオン結合部位であると提唱されている⁽¹³⁾。枯草菌べん毛モーターの H^+ 駆動型固定子 MotAB と Na^+ 駆動型固定子 MotPS の MotB または MotS サブユニットにおいても高度にアスパラギン酸残基が保存されている。

本研究では、枯草菌の MotB-D24E 株と MotS-D30E 株から取得された運動性向上株に着目して運動性解析を行った。大腸菌の MotB の 32 番目のアスパラギン酸残基をグルタミン酸残基に置換された変異株は、若干ではあるが運動性を示す⁽¹³⁾。枯草菌のアミノ酸残基置換変異株である MotB-D24A 株、MotB-D24N 株、MotB-D24E 株、MotS-D30A 株、MotS-D30N 株、MotS-D30E 株において軟寒天培地上の運動性試験を行った。MotB シリーズは 0.25% 軟寒天培地(pH 7.0)に植菌し、MotS シリーズは 0.25% 軟寒天培地(pH 8.0)または、0.25% 軟寒天培地(pH 8.0、200 mM NaCl)に植菌し、37℃、16 時間、静置培養後の運動性を観察した(図 3-1)。その結果、MotB-D24 のアミノ酸残基置換変異株において運動性を観察することは出来なかった。また、MotS-D30 のアミノ酸残基置換変異株の運動性は 0.25% 軟寒天培地(pH 8.0)では観察することが出来なかった。しかし、200 mM の NaCl を添加した 0.25% 軟寒天培地(pH 8.0、200 mM NaCl)でのみ MotS-D30E 株の運動性を観察することが出来た(図 3-1C)。また、MotB-D24E 株と MotS-D30E 株から取得された運動性向上株の軟寒天培地上での運動性試験を行った結果、運動性の向上を観察することが出来た。MotB-D24E-up 株は

MotAB 株と比較して 46%程度の運動性を示し、MotS-D30Eup 株は 200 mM の NaCl を添加した 0.25%軟寒天培地(pH 8.0、200 mM NaCl)上で MotPS 株と比較して平均 26%程度の運動性を示した。また、運動性向上株から同定された変異を導入した変異株 MotB-D24E/T181A 株、MotP-L172P/MotS-D30E 株においても軟寒天培地上での運動性を観察することが出来た。MotB-D24E/T181A 株は MotB-D24Eup 株と比較して 42%程度、MotP-L172P/MotS-D30E 株は MotS-D30Eup 株とほぼ同等の運動性を示した。次に運動性向上株から同定された変異のみを導入した変異株 MotB-T181A 株と MotP-L172P 株の運動性試験を行った。MotB-T181A 株は MotB-D24E/T181A 株と比較して 571%、MotAB 株と比較して 80%の運動性を示した。MotB-T181A 株は、野生型である MotAB 株とほぼ同等の運動性を有していた。MotP-L172P 株は MotP-L172P/MotS-D30E 株と比較して 34%、MotPS 株と比較して 19%程度の運動性を示した。NaCl が添加されていない培地上において、MotP-L172P 株の運動性はほとんど観察することが出来なかった。

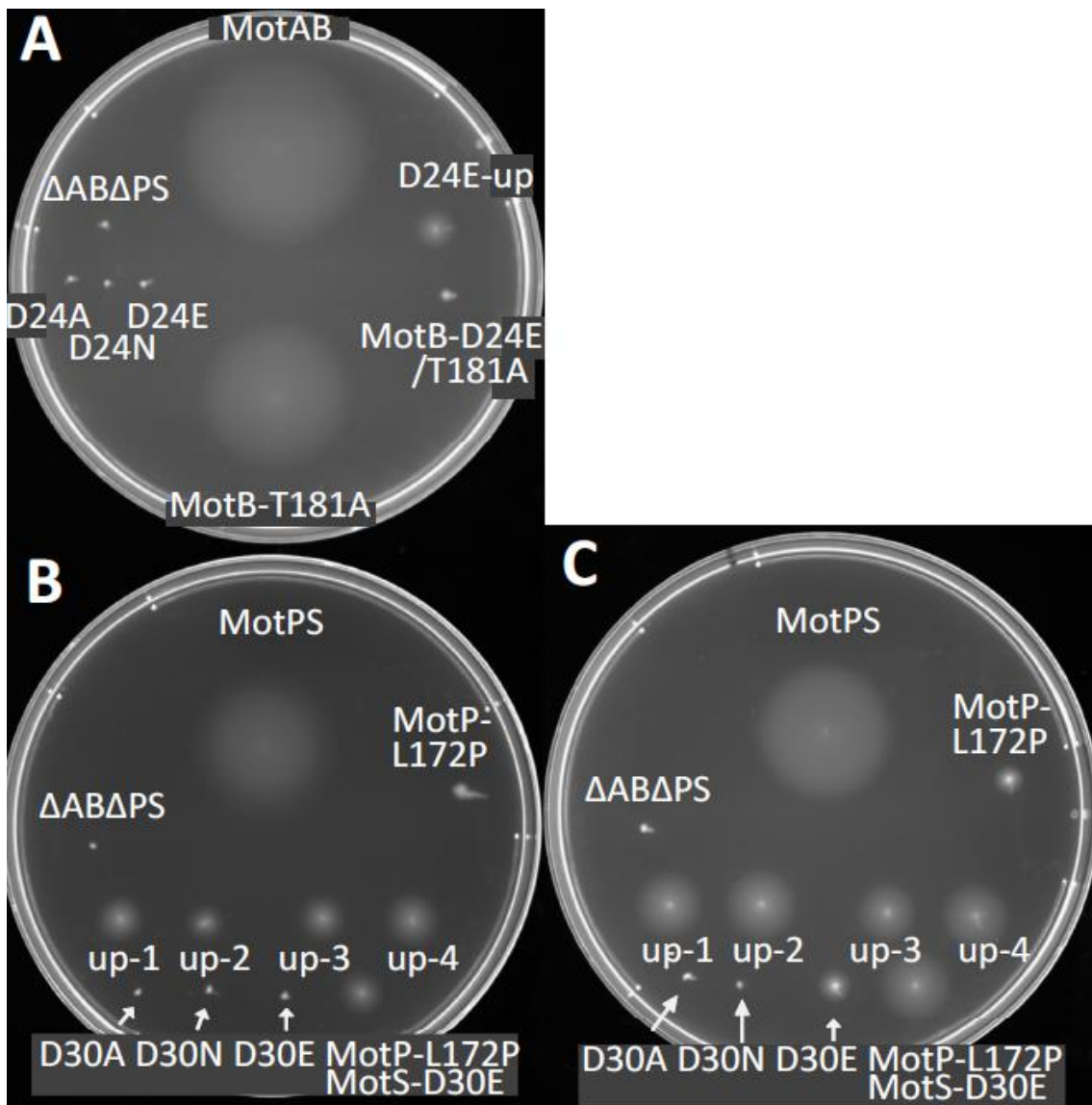


図 3-1. MotB-D24 置換変異株、MotS-D30 置換変異株における軟寒天培地上での運動性試験

A : MotB-D24 アミノ酸置換変異株における 0.25%軟寒天培地(pH 7.0)で 37°C、16 時間培養後の運動性

B : MotS-D30 アミノ酸置換変異株における 0.25%軟寒天培地(pH 8.0)で 37°C、16 時間培養後の運動性。

C : MotS-D30 アミノ酸置換変異株における 0.25%軟寒天培地(pH 8.0、200 mM NaCl)で 37°C、16 時間培養後の運動性。

2. アミノ酸置換変異株における液体培地中での運動性解析

各菌株の液体培地中における遊泳速度を測定した。MotB-D24 シリーズは、Spizizen I 培地(pH 7.0)を用いて 37°C、200rpm、約 6 時間($OD_{600} \doteq 0.5$)培養を行い、遊泳速度を測定した。しかし、MotB-D24 置換変異株、MotB-D24Eup 株や MotB-D24E/T181A 株に関しては遊泳を観察することができなかった。MotB-T181A 株は MotAB 株と同等の遊泳速度を示した(約 20 $\mu\text{m/s}$)。MotS-D30E 株、MotS-D30Eup 株、MotP-L172P/MotS-D30E 株は、SpizizenI 培地(pH 8.0、200 mM NaCl)を用いて 37°C、200 rpm、約 6 時間($OD_{600} \doteq 0.5$)培養を行い、遊泳速度を測定した。その結果を、図 3-2 にまとめた。各菌株の遊泳速度は野生型である MotPS 株で約 7 $\mu\text{m/s}$ 、MotP-D30Eup 株や MotP-L172P/MotS-D30E 株では約 2 $\mu\text{m/s}$ であった。MotS-D30E 株は、遊泳を観察することが出来なかった。

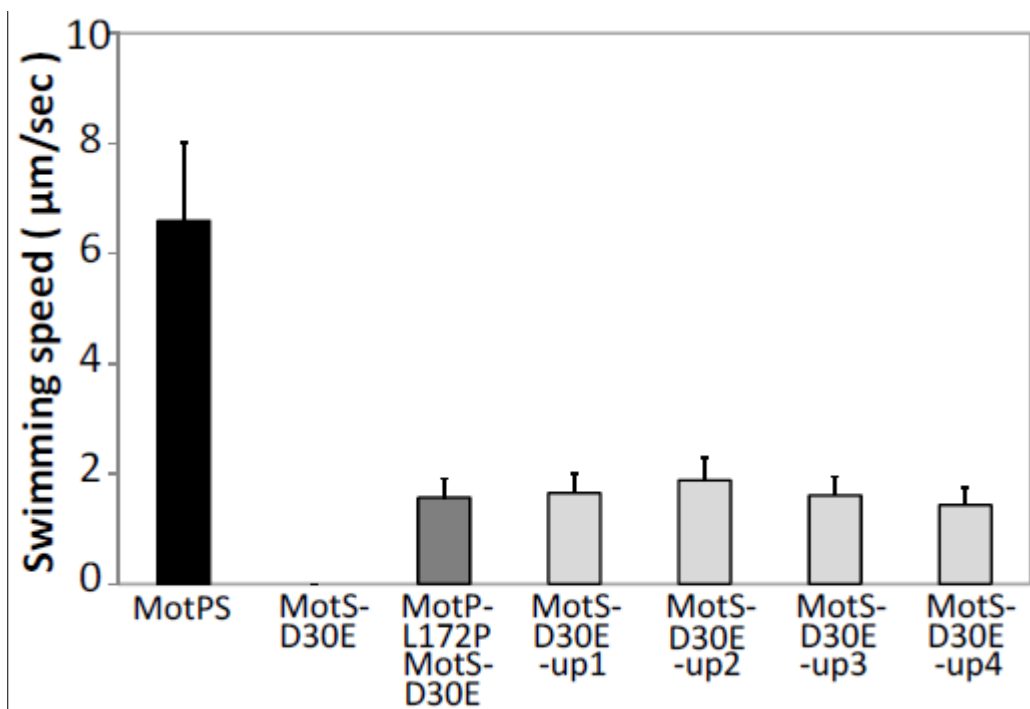


図 3-2.MotS-D30E 運動性向上株における遊泳速度

S pizizen I 培地(pH 8.0、200 mM NaCl)で 37℃、200 rpm で約 6 時間培養後の遊泳速度を示した。液培地中の細胞を 50 細胞以上計測した。エラーバーは標準偏差を示している。

3. アミノ酸置換変異株におけるべん毛染色

本研究に用いた各菌株の運動性への影響がべん毛の本数によるものではないか確認するためにべん毛染色を行った。その結果を表 3-3 にまとめた。べん毛の本数は野生株である MotAB 株や MotPS 株と比較して、運動性向上株や変異導入株のべん毛の本数は減少傾向であることが観察できた。しかし、べん毛本数と運動性の減少に相関関係が見られなかった。よって、アミノ酸置換変異株のべん毛の本数の減少は、運動性に影響しないと考えた。固定子に変異導入を行うことによりべん毛の本数は減少するが、運動性には影響しないと考えた。

表 3-3. MotB-D24 置換変異株、MotS-D30 置換変異株のべん毛本数

菌株	1 細胞あたりのべん毛の本数	計測数
MotAB	7.0 ± 2.1	33
MotPS	6.1 ± 1.5	25
MotB-D24E	4.2 ± 0.8	34
MotB-D24E-up	5.0 ± 1.5	43
MotB-D24E/T181A	4.5 ± 1.7	35
MotB-T181A	6.3 ± 1.5	43
MotS-D30E	4.3 ± 1.6	47
MotS-D30E-up1	4.5 ± 1.1	44
MotS-D30E-up2	4.4 ± 1.3	35
MotS-D30E-up3	4.6 ± 1.4	37
MotS-D30E-up4	4.5 ± 1.5	36
MotP-L172P/MotS-D30E	4.2 ± 1.5	40
MotP-L172P	3.5 ± 0.8	40

計測数は、べん毛の本数を計測した菌体数を示す。

4. ウェスタンブロット解析によるアミノ酸残基置換変異株の膜画分における固定子の発現量の検討

アミノ酸残基置換変異株の膜画分における固定子の発現量の検討をウェスタンブロット解析により行った。MotB-D24 置換変異株は、抗 MotA 抗体によって検出した MotA サブユニットの膜画分における発現量が MotAB 株と比較して顕著に低下(0.1 以下)していた。MotS-D30 置換変異株は、抗 MotS 抗体によって検出した MotS サブユニットの膜画分における発現量が MotPS 株と比較して顕著に低下(0.2 以下)していた。また、抗 MotP 抗体についても検出検討を行ったが MotP サブユニットの発現シグナルを確認することが出来なかった。MotB-D24Eup 株、MotS-D30Eup 株、MotB-D24E/T181A 株、MotB-T181A 株において検出した発現量は、野生株である MotAB 株や MotPS 株と同等かそれ以上だった。しかし、MotP-L172P/MotS-D30E 株や MotP-L172P 株は MotPS 株と比較すると半分程度まで固定子サブユニットの発現量が低下していた。このことから MotP-L172P が MotPS の構造に影響を与えたため、固定子複合体が不安定化したと推定した。

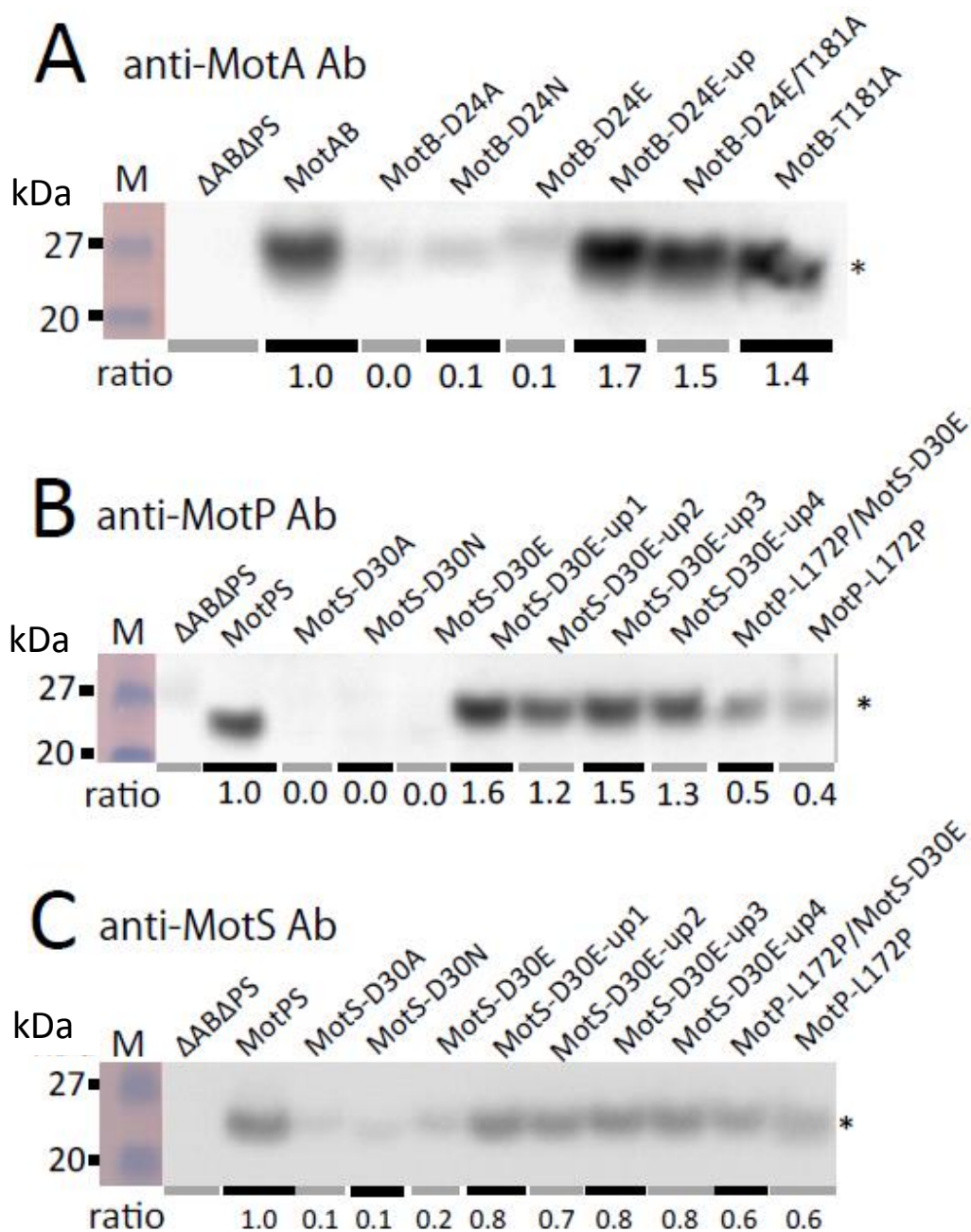


図 3-3. MotB-D24 置換変異株、MotS-D30 置換変異株における
ウエスタンブロット解析による膜画分での固定子タンパクの発現量の検討
各サンプルは 30 μ g 泳動した。各レーンにサンプル名を記載した。
A: 抗 MotA ポリクローナル抗体を用いて検出した。
B: 抗 MotP ポリクローナル抗体を用いて検出した。
C: 抗ポリクローナル抗体を用いて検出した。
M: BLUE Star Prestained Protein-Ladder (日本ジェネティクス)
*: 目的のバンドの位置を示す。

第四節 考察

枯草菌が持つ H^+ 駆動型固定子 MotAB の MotB サブユニットと Na^+ 駆動型固定子 MotPS の MotS サブユニットに高度に保存されているアスパラギン酸残基に置換変異導入を行った。MotS-D30E 株以外のアミノ酸残基置換変異株は、運動性を観察することは出来なかった(図 3-1)。また、MotB-D24 置換変異体、MotS-D30 置換変異体の固定子の発現量は野生株と比較すると 0.2 以下であった。このことから、固定子の発現量の低下が運動性の低下を引き起こしている可能性が考えられる。しかし、ウエスタンブロット解析による固定子の発現量が低下していても十分な運動性を示すことが出来ることを第 2 章で示している。第 2 章で解析を行った MotA-E92A 株と MotP-D91A 株はウエスタンブロット法による解析結果から固定子の膜画分における発現量は 0.1 以下であった。しかし、運動性は野生株の 50%以上を示した。この結果は、ウエスタンブロット解析による膜画分での固定子の発現量が 0.1 程度であっても十分な運動性を有することが可能であることを示している。MotP-D30E 株は、200 mM の NaCl を添加した培地上では十分な運動性を示すにも関わらず、抗 MotS 抗体における発現量は野生株と比較して 0.2 程度であった。また、抗 MotP 抗体を用いた検出においてはシグナルを確認することは出来なかった。MotB-D24 置換変異株や MotS-D30 置換変異株における運動性試験や固定子の発現量の検討から、枯草菌の MotB-D24 や MotS-D30 は運動性に重要なアミノ酸残基であると推察した。MotB-D24 や MotS-D30 が固定子の機能に重要である場合、MotB-D24E 株や MotS-D30E 株から取得された運動性向上株の変異は固定子の機能または、イオン透過機構に関与していると考えられる。

MotB-D24Eup 株と MotS-D30Eup 株の固定子アミノ酸アミノ酸配列から同定

された変異は、MotB-D24Eup 株では MotB-T181A、MotS-D30Eup 株では MotP-L172P であった。運動性向上株である MotB-D24Eup 株と MotS-D30Eup 株の変異型固定子を導入した株である MotB-D24E/T181A 株と MotP-L172P/MotS-D30E 株を作製し、運動性解析を行った。その結果、MotS-D30Eup 株と MotP-L172P/MotS-D30E 株の運動性はほぼ同等であった。この結果から、MotS-D30Eup 株の運動性向上に MotP-L172P が関与していることが示唆された。MotB-D24Eup 株と比較して MotB-D24E/T181A 株の運動性は明らかに低下していた。この結果から、MotB-D24Eup 株の運動性向上には、染色体に複数の変異が必要である可能性を示唆した。固定子や回転子などのべん毛モーター関連遺伝子以外に変異が入ることでも、運動性向上株が取得されることは既に報告されている。

枯草菌 MotB-D24Eup 株から同定された MotB-T181A は、MotB サブユニットのペプチドグリカン側の C 末端領域に位置する。MotB の C 末端領域は、サルモネラ菌やピロリ菌で結晶構造が決定している^(44,45,46)。これらの報告を基に MotB の C 末端領域の立体構造における枯草菌 MotB-T181 の位置を当てはめた。枯草菌、サルモネラ菌、ピロリ菌の MotB サブユニットのアミノ酸配列のマルチプルアライメントを ClustalW を用いて行った(図 3-4. A)。アミノ酸配列の比較を行った結果、MotB-T181 は、ペプチドグリカン結合モチーフ(PGB)の近傍に位置すると同定された。また、MotB-T181 と同様箇所に位置するスレオニン残基は、ピロリ菌の研究から固定子複合体形成に重要であることが報告されている⁽¹⁴⁾。また、大腸菌で、枯草菌 MotB-T181 と同じ同様箇所に位置する大腸菌 MotB - T196I 変異体は固定子機能の欠失を引き起こすことが報告されている⁽¹²⁾。これらのことから、運動性向上株 MotB-D24Eup におけるサプレッサー変異 MotB-T181A は、固定子の複合体形成または構造に影響したため、間

接的ではあるが共役イオンの流れに影響を与えることができたのではないかと考えた。

枯草菌 MotS-D30Eup から同定された MotP-L172P は、MotP サブユニットの 3 番目の膜貫通領域に存在すると推定した。べん毛モーター固定子複合体の結晶構造は、MotB の C 末端親水性領域を除いて決定されていない。そのため、以前報告がなされた大腸菌の固定子 MotAB の架橋実験から膜貫通領域のアミノ酸残基位置が予測されている⁽¹¹⁾。枯草菌の MotP サブユニットと大腸菌の MotA サブユニットのアミノ酸配列のマルチプルアライメントを ClustalW を用いて行った(図 3-4. B)。アミノ酸配列の比較を行った結果、MotP-L172 は、3 番目の膜貫通領域のペリプラズム側に位置していると推定した。MotP-L172 は、共役イオンの流入経路を形成している α ヘリックス構造面に対して裏側の面に位置する(図 3-4. C)。ロイシン残基からプロリン残基へ置換されたことによってプロリン残基の側鎖が共役イオンの流入経路の構造に影響したのではないかと考えた。したがって、MotS-D30Eup の運動性向上は MotP-L172P によって引き起こされた共役イオンの流入経路の構造変化が影響した結果だと考えた。しかし、MotP-L172P の変異だけでは Δ MotPS の運動性を相補しないため、MotP-L172P は MotS-D30E において Na^+ が特異的に結合しやすい構造に変化したと推察した。

枯草菌の MotB-D24 と MotS-D30 の置換変異株を用いて解析を行った結果、MotB-D24 と MotS-D30 が固定子の機能に重要であることが明らかになった。また、MotB-D24Eup と MotS-D30Eup の解析により共役イオンの流入経路または固定子の複合体としての構造維持が重要であることが考えられた。

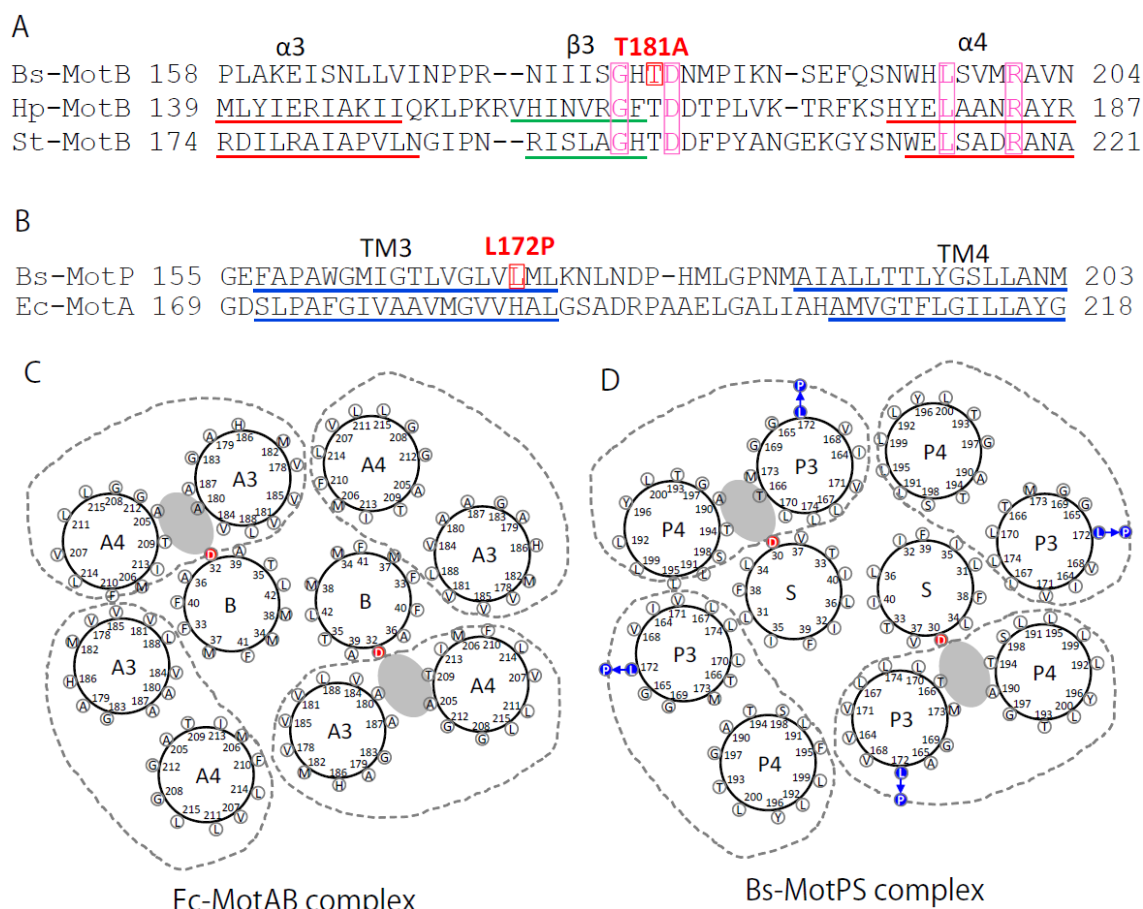


図 3-4. 枯草菌運動性向上株における変異同定箇所の推定

- A:** 枯草菌(Bs-MotB)、サルモネラ菌(St-MotB)、ピロリ菌(Hp-MotB)の MotB サブユニットの C 末端領域の構造予測。ピンクの文字で示すアミノ酸残基は OmpA ファミリーの PGB タンパクに高度に保存されている。赤のラインは α -helix、緑のラインは β -strand。赤字は MotB-D24E 運動性向上株の変異導入箇所。
- B:** 枯草菌 MotP(Bs-MotP)、大腸菌 MotA(Ec-MotA)の 3 番目と 4 番目の膜貫通領域のマルチプルアライメント。赤字は MotS-D30E 運動性向上株の変異導入箇所。
- C:** 大腸菌べん毛モーター固定子 MotAB 複合体共役イオン流入経路モデル。赤字は共役イオン結合部位
- D:** 枯草菌べん毛モーター固定子 MotPS 複合体共役イオン流入経路モデル。赤字は共役イオン結合部位。青字は MotS-D30E 運動性向上株の変異導入箇所

第四章 枯草菌と好アルカリ性細菌 *Bacillus pseudofirmus* OF4 の Na⁺ 駆動型固定子 MotPS の中性環境における Na⁺親和性の差異の解明

第一節 緒言

好アルカリ性 *Bacillus* 細菌は、アルカリ性環境で H⁺駆動力が低く利用しづらいため、Na⁺駆動力を利用していると考えられている。好アルカリ性 *Bacillus* 細菌のべん毛は、共役イオンとして Na⁺が利用されていることが報告されている⁽⁴⁸⁾。べん毛モーターの Na⁺駆動型固定子 MotPS は、好アルカリ性 *Bacillus* 属細菌から同定された⁽¹⁶⁾。*B. pseudofirmus* OF4 は通性好アルカリ性細菌であり、中性環境でも生育することが可能である。しかし、運動性に関しては pH 8.0~10.0 では Na⁺濃度に依存した運動性を示すが、中性である pH 7.0 では高濃度の Na⁺を要求する⁽³⁶⁾。中性環境では、H⁺と Na⁺における競合阻害によってべん毛の運動性が低下すると考えられている。しかし、枯草菌は中性環境でも Na⁺濃度に依存した運動性を示す⁽¹⁸⁾。このことから、好中性細菌である枯草菌のべん毛モーターNa⁺駆動型固定子 MotPS と好アルカリ性細菌である *B. pseudofirmus* OF4 のべん毛モーターNa⁺駆動型固定子 MotPS では Na⁺に対する親和性が異なることが示唆された。

当研究室の卒業生である野口によって、*B. pseudofirmus* OF4 由来の Na⁺駆動型固定子 MotPS を発現する枯草菌（以降、OFPS と称する）の中性環境での運動性解析が行われた。しかし、OFPS は pH 7.0 では NaCl を 200 mM 添加した軟寒天培地上でも運動性を示さなかった⁽⁶¹⁾。その後、OF4PS を用いて pH 7.0 に

調整した培地に 200 mM の NaCl を添加した条件下で自然突然変異により運動性復帰株が取得された。取得された運動性復帰株の *motPS* 遺伝子領域のシーケンス解析によって MotP サブユニットの 186 番目のアスパラギン残基がアスパラギン酸残基に置換されていた点変異と *motPS* 遺伝子のリボソーム結合領域の繰り返し配列が同定された⁽⁴⁹⁾。

本章では、上記の運動性復帰株から同定された変異が運動性の復帰に関与しているかを検証するため、同定された変異を導入した株を作製し、その解析を行った。また、取得した運動性復帰株を用いて中性環境における低 Na⁺濃度下での運動性向上株の取得を試みた。さらに、取得した運動性向上株の *motPS* 遺伝子領域のシーケンス解析により変異箇所の同定と取得した運動性向上株の生理学的解析を試みた。

第二節 実験材料と方法

第一項 実験材料

1. 使用菌株と使用プラスミド

本研究で使用した菌株を表 4-1 に、使用したプラスミドを表 4-2 に示した。大腸菌の培養には LB 培地を使用した。大腸菌形質転換体の培養には、必要に応じて LB 培地に 100 $\mu\text{g/ml}$ なるようにアンピシリンナトリウム(以降 Amp¹⁰⁰ と省略)を添加した。枯草菌の培養には LB 培地または Spizizen 培地を使用した。抗生物質は、菌株に合わせて適宜添加した。エリスロマイシンは 1 $\mu\text{g/ml}$ (以降 Erm¹ と省略)軟寒天培地を用いた運動性試験には、Spizizen 培地に 0.25% の Noble Agar (Becton Dickinson 社)を加えた軟寒天培地を使用した。

表 4-1. 使用した菌株

菌株	遺伝子型または説明	リファレンス
大腸菌(<i>Escherichia coli</i>)		
DH5α MCR	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ1 (<i>mrr-hsd RMS-mcrBC</i>) Φ80 <i>dlacZ</i> Δ(<i>lacZYAargF</i>) <i>U169 deoR recA1 endA1 supE44 λthi-1 gyr-496 relA1</i>	Stratagene
枯草菌(<i>Bacillus subtilis</i>)		
BR151MA	<i>lys3 tripC2</i> (wild type)	(37)
ΔABΔPS	BR151MA Δ <i>motAB</i> Δ <i>motPS</i>	(25)
P _{XylA} -PS (BSPS)	ΔABΔPS <i>lacA::P_{XylA}-motPS</i> from BR151MA	第 2 章
BSPS-PK175Q	ΔABΔPS <i>lacA::P_{XylA}-motPS</i> (MotP-K175Q) from BR151MA	本研究
OF4PS	ΔABΔPS <i>amyE::P_{motAB}-motPS</i> from <i>B. pseudofirmus</i> OF4	(49)
OF4PS-7up	spontaneous up-motile variant from OF4PS	(49)
OFPS	ΔABΔPS <i>lacA::P_{XylA}-motPS</i> from <i>B. pseudofirmus</i> OF4	本研究
OFPS-PQ175K	ΔABΔPS <i>lacA::P_{XylA}-motPS</i> (MotP-Q175K) from <i>B. pseudofirmus</i> OF4	本研究
C125PS	ΔABΔPS <i>lacA::P_{XylA}-motPS</i> from <i>Bacillus halodurans</i> C125	本研究
C125PS-PQ176K	ΔABΔPS <i>lacA::P_{XylA}-motPS</i> (MotP-Q176K) from <i>Bacillus halodurans</i> C125	本研究
C125PS-PN187D	ΔABΔPS <i>lacA::P_{XylA}-motPS</i> (MotP-N187D) from <i>Bacillus halodurans</i> C125	本研究
M1	ΔABΔPS <i>lacA::P_{XylA}-motPS</i> from OF4PS-7up	本研究
M2	ΔABΔPS <i>lacA::P_{XylA}-motPS</i> from OF4PS direct repeat sequence in RBS	本研究
M3 (OFPS-PN186D)	ΔABΔPS <i>lacA::P_{XylA}-motPS</i> from OF4PS MotP-N186D	本研究
M3up-1	spontaneous up-motile variant-1 from M3	本研究
M3up-2	spontaneous up-motile variant-2 from M3	本研究
M3up-3	spontaneous up-motile variant-3 from M3	本研究
M3up-4	spontaneous up-motile variant-4 from M3	本研究
M3up-5	spontaneous up-motile variant-5 from M3	本研究

表 4-1. 使用した菌株 (続き)

菌株	遺伝子型または説明	リファレンス
枯草菌(<i>Bacillus subtilis</i>)		
MotS-S37T	$\Delta AB\Delta PS$ <i>lacA::P_{xylA}-motPS</i> (MotP-N186D, MotS-S37T) from M3up-1	本研究
MotS-I47T	$\Delta AB\Delta PS$ <i>lacA::P_{xylA}-motPS</i> (MotP-N186D, MotS-I47T) from M3up-2	本研究
MotS-S48P	$\Delta AB\Delta PS$ <i>lacA::P_{xylA}-motPS</i> (MotP-N186D, MotS-S48P) from M3up-3	本研究
MotS-S50P	$\Delta AB\Delta PS$ <i>lacA::P_{xylA}-motPS</i> (MotP-N186D, MotS-S50P) from M3up-4	本研究
MotS-V130A	$\Delta AB\Delta PS$ <i>lacA::P_{xylA}-motPS</i> (MotP-N186D, MotS-V130A) from M3up-5	本研究
OF+BS-Plug	$\Delta AB\Delta PS$ <i>lacA::P_{xylA}-motPS</i> (OF4) +BS-Plug	本研究
BS+OF-Plug	$\Delta AB\Delta PS$ <i>lacA::P_{xylA}-motPS</i> (BS) +OF-Plug	本研究

表 4-2. 使用したプラスミド

プラスミド	説明	リファレンス
pGEM-7zf(+)	Cloning vector; Ap ^R	Promeg
pAX01	<i>lacA</i> integration vector with Em ^R gene and P _{xylA} promoter upstream of multiple cloning site	(39)
pGEM-PS	pGEM-7(+)+P _{motAB} - <i>motPS</i> from BR151MA	第 2 章
pGEM-OFPS	pGEM-7(+)+ <i>motPS</i> from <i>B. pseudofirmus</i> OF4	本研究
pGEM-C125PS	pGEM-7(+)+ <i>motPS</i> from <i>Bacillus halodurans</i> C125	本研究
pAX-P _{xylA} -MotPS	pAX01+P _{xylA} - <i>motPS</i> from BR151MA	第 2 章
pAX-P _{xylA} -BSPS-MotPK175Q	pAX01+P _{xylA} - <i>motPS</i> (MotP-K175Q) from BR151MA	本研究
pDR67- OF4PS	pDR67+P _{motAB} - <i>motPS</i> from <i>B. pseudofirmus</i> OF4	(49)
pAX-P _{xylA} -OFPS	pAX01+P _{xylA} - <i>motPS</i> from <i>B. pseudofirmus</i> OF4	本研究
pAX-P _{xylA} -OFPS-MotPQ175K	pAX01+P _{xylA} - <i>motPS</i> (MotP-Q175K) from <i>B. pseudofirmus</i> OF4	本研究
pAX-P _{xylA} -C125PS	pAX01+P _{xylA} - <i>motPS</i> from <i>Bacillus halodurans</i> C125	本研究
pAX-P _{xylA} -C125PS-MotPQ176K	pAX01+P _{xylA} - <i>motPS</i> (MotP-Q176K) from <i>Bacillus halodurans</i> C125	本研究
pAX-P _{xylA} -C125PS-MotPN187D	pAX01+P _{xylA} - <i>motPS</i> (MotP-N187D) from <i>Bacillus halodurans</i> C125	本研究
pDR-P _{motAB} -OFPS-M1	pDR67+P _{motAB} - <i>motPS</i> from OF4PS-7up	(49)
pDR-P _{motAB} -OFPS-M2	pDR67+P _{motAB} - <i>motPS</i> , direct repeat sequence in RBS	(49)
pDR-P _{motAB} -OFPS-M3	pDR67+P _{motAB} - <i>motPS</i> -MotP-N186D	(49)
pAX-P _{xylA} -OFPS-M1	pAX01+P _{xylA} - <i>motPS</i> from OF4PS-7up	本研究
pAX-P _{xylA} -OFPS-M2	pAX01+P _{xylA} - <i>motPS</i> , direct repeat sequence in RBS	本研究
pAX-P _{xylA} -OFPS-M3	pAX01+P _{xylA} - <i>motPS</i> -MotP-N186D	本研究
pAX-P _{xylA} -OFPS-M3up-1	pAX01+P _{xylA} - <i>motPS</i> from M3up-1	本研究
pAX-P _{xylA} -OFPS-M3up-2	pAX01+P _{xylA} - <i>motPS</i> from M3up-2	本研究
pAX-P _{xylA} -OFPS-M3up-3	pAX01+P _{xylA} - <i>motPS</i> from M3up-3	本研究
pAX-P _{xylA} -OFPS-M3up-4	pAX01+P _{xylA} - <i>motPS</i> from M3up-4	本研究
pAX-P _{xylA} -OFPS-M3up-5	pAX01+P _{xylA} - <i>motPS</i> from M3up-5	本研究
pAX-P _{xylA} -OFPS+BS-Plug	pAX01+P _{xylA} - <i>motPS</i> (OF4)+BS-Plug	本研究
pAX-P _{xylA} -BSPS+OF-Plug	pAX01+P _{xylA} - <i>motPS</i> (BS)+OF-Plug	本研究

2. 使用培地と試薬の組成

LB 培地

第二章 第二節 第一項参照

SOB 培地

第二章 第二節 第一項参照

SOC 培地(g/L)⁽²⁶⁾

第二章 第二節 第一項参照

STET 溶液

第二章 第二節 第一項参照

Lysozyme 溶液

第二章 第二節 第一項参照

RF1 培地(コンピテントセル調製用)

第二章 第二節 第一項参照

RF2 培地(コンピテントセル調製用)

第二章 第二節 第一項参照

10×Spizizen salt・形質転換用

第二章 第二節 第一項参照

Spizizen I 培地

第二章 第二節 第一項参照

Spizizen II 培地

第二章 第二節 第一項参照

TBAB 培地

第二章 第二節 第一項参照

10×Spizizen salt・運動解析用

第二章 第二節 第一項参照

0.25%軟寒天培地(pH 7.0、2% Xylose)(/ 200 ml)⁽³⁰⁾

10×Spizizen salt・運動解析用	20 ml
1 M Glucose	5 ml
2% Casamino acids	2 ml
10% Yeast extract	2 ml
10 mg/ml Amino acids (Trp、Lys)	1 ml
50% Xylose	8 ml
4 M KOH	1 ml
dH ₂ O	160 ml
Noble agar (Difco)	0.5 g

それぞれ別々にオートクレーブで 121℃、20 分間の滅菌を行った。寒天は dH₂O に混合した後、オートクレーブで 121℃、20 分間の滅菌を行った。滅菌後、寒天が含まれている dH₂O に上記の組成で試薬を混合した。

0.25%軟寒天培地(pH 7.0、2% Xylose)は運動性試験に用いた。運動性解析時には各濃度(5 mM、10 mM、15 mM、30 mM、55 mM、105 mM、205 mM)になるように 4M NaCl を添加した。

0.1 M PMSF

第二章 第二節 第一項参照

0.1 M NaOH

第二章 第二節 第一項参照

2% Na₂CO₃ (Lowry 法試薬)

第二章 第二節 第一項参照

0.5% CuSO₄ · 5H₂O (g/L) (Lowry 法試薬)

第二章 第二節 第一項参照

1% クエン酸ソーダ (g/L) (Lowry 法試薬)

第二章 第二節 第一項参照

0.05 M Tris-HCl (pH 8.0)

第二章 第二節 第一項参照

10×TG Buffer

第二章 第二節 第一項参照

10×TBS Buffer (g/L)⁽¹²⁾

第二章 第二節 第一項参照

タンパク質抽出液

第二章 第二節 第一項参照

Lowry 試薬⁽¹²⁾

第二章 第二節 第一項参照

2×サンプル Buffer

第二章 第二節 第一項参照

TGM Buffer

第二章 第二節 第一項参照

TTBS Buffer

第二章 第二節 第一項参照

10%(w/v)ブロッキング溶液

第二章 第二節 第一項参照

一次抗体溶液の場合、10%(w/v)ブロッキング溶液に抗 OF-MotP ポリクローナル抗体を約 3,000 倍希釈になるように添加した。

二次抗体の場合、5%(w/v)ブロッキング溶液にヤギ抗ウサギ IgG-HRP conjugated (Bio-Rad)を約 5,000 倍になるように添加した。

ウエスタンブロット解析用化学発光検出薬

ECL Western Blotting Detection Kit (GE ヘルスケアジャパン)

第二項 実験手法

1. MotP サブユニットのアミノ酸配列を用いた系統樹作製とアミノ酸配列比較

B. pseudofirmus OF4 の MotP サブユニットのアミノ酸配列を

UniProt(www.uniprot.org/)を利用してアミノ酸配列を取得した。次に NCBI Blast(protein sequence Blast)(<http://www.ncbi.nih.gov/>)を利用し、他の細菌の MotA サブユニットのアミノ酸配列を取得した。取得した MotP サブユニットのアミノ酸配列の詳細は表 4-3 にまとめた。これらを用いて Multiple Sequence Alignment by CLUSTALW(<http://www.genome.jp/tools/clustalw/>)での系統樹作製とアライメント解析を行った。

表 4-3. MotP サブユニットのアライメントに使用した菌種と略称とアクセス番号の一覧

菌種	略称	Accession number
<i>Bacillus pseudofirmus</i> OF4	OF4_MotP	YP_003425722
<i>Bacillus halodurans</i> C125	C125_MotP	NP_244106
<i>Oceanobacillus iheyensis</i>	OI_MotP	NP_693146
<i>Bacillus licheniformis</i>	BL_MotP	YP_080264
<i>Bacillus megaterium</i>	BM_MotP	AAA22296
<i>Bacillus subtilis</i>	BS_MotP	ZP_03592764
<i>Halobacillus halophilus</i>	HH_MotP	YP_006181427
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	BAM_MotP	YP_005542579.1
<i>Bacillus alcalophils</i>	BAL_MotP	WP_003320987.1
<i>Bacillus cellulosilyticus</i>	BCE_MotP	WP_013489845.1
<i>Bacillus selenitireducens</i>	BSE_MotP	WP_013172211.1
<i>Bacillus sonorensis</i>	BSO_MotP	WP_006638023.1
<i>Bacillus coahuilensis</i>	BCO_MotP	WP_010174259.1
<i>Ornithinibacillus scapharcae</i>	OBS_MotP	WP_010096164.1
<i>Salimicrobium</i> sp.	SASP_MotP	WP_008590858.1

2. 好アルカリ性細菌由来固定子遺伝子 *motPS* のクローニング

固定子遺伝子に対して部位特異的変異導入を PCR 反応により行うための鋳型となるプラスミドを作製した。*B. pseudofirmus* OF4 または *B. halodurans* C125 の染色体を鋳型として PCR 法を用いて固定子遺伝子の増幅を行った。今回 PCR 反応に使用したプライマーは表 4-4 にまとめた。PCR 反応の酵素は Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs)を用いた。PCR 反応は説明書に準じて行った。サーマルサイクラーは、日本バイオラッドラボラトリー社の i cycler を使用した。得られた PCR 産物を、PCR purification kit (QIAGEN)を用いて精製した。各遺伝子をクローニングするためにベクターとして用いる pGEM7-zf(+)を制限酵素 *Sma*I (New England Biolabs)で切断した。制限酵素反応は、説明書に準じて行った。各 DNA 断片を PCR purification kit (QIAGEN)により精製後、Quick Ligation kit (New England Biolabs)を用いて、説明書に準じて DNA 断片の連結を行った。次に、塩化ルビジウム法⁽⁴¹⁾によって製作した DH5 α MCR のコンピテントセルに各反応液を添加し、形質転換を行った。形質転換を行った細胞を最終濃度が 100 μ g/ml になるようにアンピシリンを添加した S-Gal/LB Agar Blend (SIGMA)に塗布し、37°Cで一晩静置培養を行った。得られたコロニーから Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega)を用いてプラスミドを回収した。取得したプラスミドを pGEM-OFPS または pGEM-C125PS とした。

選定した荷電アミノ酸残基に置換変異を導入するために pGEM-PS、pGEM-OFPS または pGEM-C125PS を Gene Tailor 変異導入システム kit (Invitrogen)の説明書に準じてメチル化を行った。次に置換変異を導入するために、メチル化した pGEM-PS、pGEM-OFPS または pGEM-C125PS を鋳型として PCR 反応を行った。今回 PCR 反応に使用したプライマーは表 4-4 にまとめた。PCR 反応の酵素は Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs)を用いた。PCR 反

応は説明書に準じて行った。PCR 反応は説明書に準じて行った。サーマルサイクラーは、日本バイオラッドラボラトリー社の i cycler を使用した。得られた PCR 産物を、PCR purification kit (QIAGEN)を用いて精製した。操作はキットに添付されているプロトコールに準じて行った。次に、得られた PCR 産物をあらかじめ塩化ルビジウム法⁽⁴¹⁾によって製作した DH5 α -T1^R のコンピテントセルに添加し、形質転換を行った。形質転換を行った細胞を LB Amp¹⁰⁰ 培地に塗布し、37°Cで一晩静置培養を行った。得られたコロニーから Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega)を用いてプラスミドを回収し、SacII(New England Biolabs)を用いて切断した。操作は説明書に準じて行った。このとき、ベクターとして用いる pAX01 も SacII (New England Biolabs)で切断した。制限酵素反応は、説明書に準じて行った。各 DNA 断片を PCR purification kit (QIAGEN)により精製後、Quick Ligation kit (New England Biolabs)を用いて、説明書に準じて DNA 断片の連結を行った。次に、塩化ルビジウム法⁽⁴¹⁾によって製作した DH5 α MCR のコンピテントセルに各反応液を添加し、形質転換を行った。得られたコロニーから Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega)を用いてプラスミドを回収した。回収したプラスミドに目的以外変異がないことをシーケンス解析により確認した。

3. *B. pseudofirmus* OF4 由来の Na⁺駆動型固定子 MotPS を発現する枯草菌の中性環境での運動性復帰株である OF4PS-7up から同定した変異型 *motPS* クローニング

枯草菌の *motAB* 遺伝子のプロモーターの下流に *B. pseudofirmus* OF4 由来の Na⁺駆動型固定子 MotPS を発現する枯草菌の中性環境での運動性復帰株である OF4PS-7up から同定した変異型 *motPS* を導入したプラスミド pDR-P_{*motAB*}-OFPS-

M1⁽⁴⁹⁾、pDR-P_{motAB}-OFPS-M2⁽⁴⁹⁾、pDR-P_{motAB}-OFPS-M3⁽⁴⁹⁾が構築された。しかし、枯草菌の *motAB* 遺伝子のプロモーターの下流に OF4PS-7up から同定した変異型 *motPS* を導入した株から作製した相補株は運動性を示さなかった。そこで、キシロース誘導プロモーターの下流に OF4PS-7up から同定した変異型 *motPS* を導入した株と野生株の構築を行った。pDR67-OF4PS、pDR-P_{motAB}-OFPS-M1⁽⁴⁹⁾、pDR-P_{motAB}-OFPS-M2⁽⁴⁹⁾、pDR-P_{motAB}-OFPS-M3⁽⁴⁹⁾を鋳型として PCR 反応を行った。今回 PCR 反応に使用したプライマーは表 4-4 にまとめた。PCR 反応の酵素は Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs)を用いた。PCR 反応は説明書に準じて行った。サーマルサイクラーは、日本バイオラッドラボラトリー社の i cycler を使用した。得られた PCR 産物を、PCR purification kit (QIAGEN)を用いて精製した。各遺伝子をクローニングするために制限酵素 *Sac*II (New England Biolabs)で切断した。このとき、ベクターとして用いる pAX01 も同様の制限酵素 *Sac*II (New England Biolabs)で切断した。制限酵素反応は、説明書に準じて行った。各 DNA 断片を PCR purification kit (QIAGEN)により精製後、Quick Ligation kit (New England Biolabs)を用いて、説明書に準じて DNA 断片の連結を行った。次に、塩化ルビジウム法⁽²⁷⁾によって製作した DH5 α MCR のコンピテントセルに各反応液を添加し、形質転換を行った。得られたコロニーから Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega)を用いてプラスミドを回収した。回収したプラスミドに目的以外変異がないことをシーケンス解析により確認した。取得したプラスミドを pAX-P_{xylA}-OFPS、pAX-P_{xylA}-OFPS-M1、pAX-P_{xylA}-OFPS-M2、pAX-P_{xylA}-OFPS-M3 とした。

表 4-4. 使用したプライマー

Primer	sequence(5'→3')	Accession number and corresponding sequence
B.S MotAB-SacII(F)	cctaaagtt ccgCgG acccaaaaccg	AL009126.3(1435315-1435291)
OF4 MotPS-SacII(R)	cattcat CCgCGG attactgc	AL009126.3(<u>2138860-2138881</u>)
BH-motPS_SacII(F)	cgtcgaactccgc accgcGG tgag	BA000004.3(<u>3360546-3360558</u>)
BH-motPS_SacII(R)	cacaagtcaat ccGcGg ccattatc	BA000004.3(3358823-3358847)
BP-MotP-Q175K-F	gggcttgctgatgctgAaaaatctaaatgacc	U91841.2BFU91841(1425-1457)
BP-MotP-Q175-R	gctgcaaaatctaaataaccctgccacacttgac	U91841.2BFU91841(1439-1474)
BSMotPK175Q (F)	ggggcttgctgatgctcCAAAaacttaacgacccgc	AL009126.3 (<u>3043562-3043599</u>)
BSMotPK175Q (R)	gagcatcagcacaagcccgacgagtgtcc	AL009126.3 (3043581-3043610)
BH-MotPQ175K-F	tggtcgggctaattccatggAaacacaagcccgat	BA000004.3 (<u>3359856-335891</u>)
BH-MotPQ176K-R	cagcatcagcacaagcccgattaaggtacc	BA000004.3 (3359846-335877)
BH-MotPN186-F	aactacctagtaaattcGatcagcacaagcccgat	BA000004.3 (<u>3359922-3359957</u>)
BH-MotPN187-R	ggtccaagagttgatggatcatttaag	BA000004.3 (3359906-3359932)
BSmotS+OFplug-R	agattcagagattgcacgaaactctgagcatcgattgggacatcgaaaagag	AB594195.1 (<u>973-1005</u>)
OFplug+BSmotS-F	ttcgtgcaatctctgaatcttttcagcaaaagacaaaaggaaggcaacgggcttc	AL009126.3(3043151-3043171) U91841.2BFU91841 (1841-1875)
OFmotS+BSplug-R	gtccactgccgctttgaatttttcagatcaacaactgacattgaaaataataag	AL009126.3 (<u>3043111-3043093</u>) AL009126.3 (3043121-3043150)
BSplug+OFmotS-F	aattcaaaagcggcagtgactcgatccaggttttgagtttttccttctgcg	U91841.2BFU91841(<u>1803-1830</u>) AL009126.3 (<u>3043112-3043140</u>)
pAX01-F	ccgctcatgagacaataaccc	U91841.2BFU91841 (1876-1899)
pAX01-R	gggggaaatgacaaatggtcc	AB5177281.1(7398-7348) D50399.1(<u>3236-3216</u>)

変異導入箇所は大文字で、制限酵素部位は赤字で示した。マイナス鎖のプライマーは Accession number に下線で示した。

4. 変異型 OFPS 株の作製

枯草菌の形質転換は、第2章、第2節、第2項の手法に準じて行った。得られた形質転換体は LB Erm^r 培地に塗布し、37°Cで一晩培養した。次に、得られたコロニーは S-Gal / LB Agar Blend (SIGMA)に最終濃度 1 µg/ml になるようにエリスロマイシンを添加した培地に植菌し、白色コロニーを形成する株を選択した。

5. 変異株における運動性試験

作製した変異株の軟寒天培地上で運動性試験を行った。運動性試験の方法は第2章、第2節、第2項、に準じて行った。様々な濃度の NaCl (5 mM、10 mM、15 mM、30 mM、55 mM、105 mM、205 mM)を添加した 0.25%軟寒天培地 (pH 7.0、2% Xylose)に植菌し、37°Cで 16 時間培養後の運動性を観察した。比較対象として、枯草菌においてキシロースの誘導によって枯草菌の Na⁺駆動型固定子 MotPS を発現する株 BSPS と BSOF と枯草菌固定子欠損株(ΔAB ΔPS)を用いた。

6. M3 を用いた運動性向上株の取得

M3 を低 Na⁺濃度である 0.25%軟寒天培地(pH 7.0、2% Xylose、5 mM NaCl)に 20 個程度植菌し、37°Cで一晩静地培養を行った。培養後、形成されたコロニーの外側を爪楊枝で突き、再度 0.25%軟寒天培地(pH 7.0、2% Xylose、5 mM NaCl)に植菌を行った。このように軟寒天培地上での植え継ぎを繰り返すことで自然突然変異による低 Na⁺濃度下での運動性向上株の取得を試みた。取得した運動性向上株の *motPS* 遺伝子配列をシーケンス解析によって変異箇所の同定を行った。

7. ウェスタンブロット解析

作製した変異株 M1、M2、M3 のウェスタンブロット解析による固定子タンパク質の膜画分における発現量の検討を行った。ウェスタンブロット解析の方法は第 2 章、第 2 節、第 2 項、に準じて行った。200 mM の NaCl を添加した Spizizen I 培地(pH 7.0)を培地とした。検出方法として、化学蛍光法を用いた。ウェスタンブロット解析用化学発光検出薬である ECL Western Blotting Detection Kit (GE ヘルスケアジャパン)を 1ml 用いてメンブレン上で 1 分間反応させた。検出器として ChemiDoc XRS Plus (Bio-Rad)を使用し、露光時間を 120 秒で画像を取得した。なお、PC アプリケーションとして QuantityOne (Bio-Rad)を使用した。検出したタンパク質の発光シグナルの発光強度と体積から発現量を算出した。

第三節 結果

1. MotP サブユニットのアミノ酸配列を用いた系統樹の作製

好中性細菌である枯草菌と好アルカリ性細菌である *B. pseudofirmus* OF4 はそれぞれ Na^+ 駆動型固定子 MotPS を持っている。しかし、枯草菌と *B. pseudofirmus* OF4 では、中性環境における Na^+ 親和性が異なる可能性が示唆された。

本研究では、様々な細菌が持つ MotP サブユニットのアミノ酸配列を比較することで、好中性細菌と好アルカリ性細菌において相違点を見つけることが出来ると考えた。*B. subtilis*、*B. pseudofirmus* OF4、*B. halodurans* C125、*B. alcalophilus*、*O. iheyensis*、*B. licheniformis*、*B. megaterium*、*Halobacillus halophilus*、*Bacillus amyloliquefaciens*、*Bacillus cellulosilyticus*、*Bacillus selenitireducens*、*Bacillus sonorensis*、*Bacillus coahuilensis*、*Ornithinibacillus scapharcae*、*Salimicrobium* sp. の MotP サブユニットのアミノ酸配列を用いて系統樹を作製した。

MotP サブユニットのアミノ酸配列から系統樹を作製した結果、好中性 *Bacillus* 属細菌、好アルカリ性 *Bacillus* 属細菌とそれ以外の細菌に MotP サブユニットをグループ分けることができた(図 4-1)。

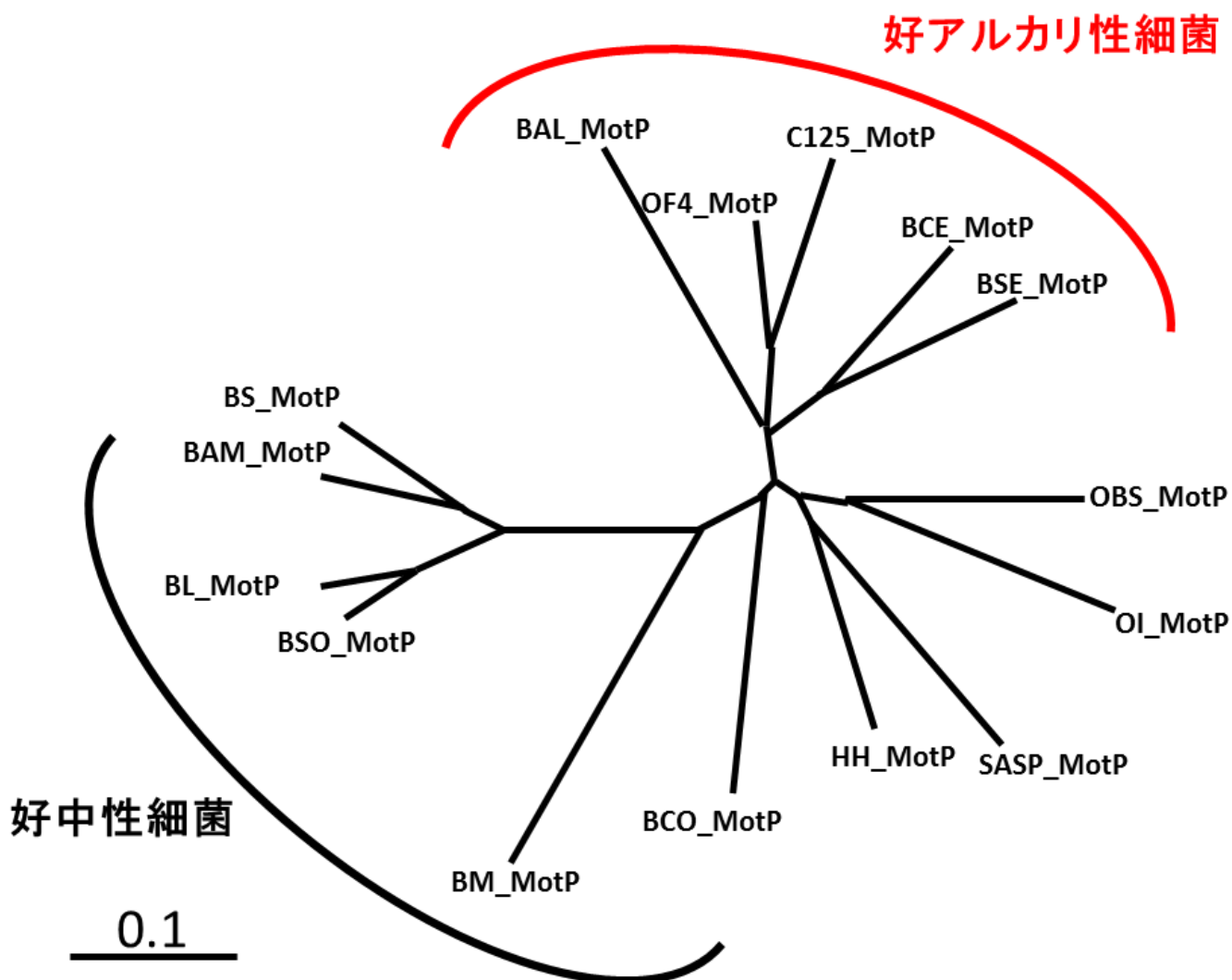


図 4-1. 好アルカリ性細菌と好中性細菌が持つ MotP サブユニットのアミノ酸配列の系統樹

好アルカリ性 *Bacillus* 属細菌を赤線で囲った。好中性 *Bacillus* 属細菌を黒線で囲った。使用した菌種と略称は表 4-3 にまとめた。サイズバーは 0.1 を示している。

2. 好中性 *Bacillus* 属細菌と好アルカリ性 *Bacillus* 属細菌の MotP サブユニットのアミノ酸配列の比較

MotP サブユニットのアミノ酸配列の系統樹を作製した結果、MotP サブユニットは好中性細菌と好アルカリ性細菌でグループに分けられた。MotP サブユニットのアミノ酸配列の違いは、中性環境における Na⁺親和性に寄与している可能性が考えられた。

好中性 *Bacillus* 属細菌 *B. subtilis*、*B. megaterium*、*B. licheniformis*、*B. amyloliquefaciens*、*B. sonorensis*、*B. coahuilensi* と好アルカリ性 *Bacillus* 属細菌 *B. pseudofirmus* OF4、*B. halodurans* C-125、*B. alcalophilus*、*B. cellulosilyticus*、*B. selenitireducens* の MotP サブユニットのアミノ酸配列の比較を行うことで、中性環境における Na⁺親和性に関与すると考えられるアミノ酸残基を推定した。

その結果、MotP サブユニットの 3 番目の膜貫通領域内で好中性 *Bacillus* 属細菌と好アルカリ性 *Bacillus* 属細菌では保存性の異なるアミノ酸残基が同定された。好中性 *Bacillus* 属ではリジン残基(K)が、好アルカリ性 *Bacillus* 属細菌ではグルタミン残基(Q)が高度に保存されていた(図 4-2)。



図 4-2. 好中性 *Bacillus* 属細菌と好アルカリ性 *Bacillus* 属細菌持つ MotP サブユニットのアミノ酸配列の比較

MotP サブユニットのアミノ酸配列の比較を行った。線より上が好アルカリ性 *Bacillus* 属細菌、下が好中性 *Bacillus* 属細菌を示している。TM3 は 3 番目の膜貫通領域を示している。それぞれのグループで保存されていた好アルカリ性 *Bacillus* 属細菌の Q を水色で、好中性 *Bacillus* 属細菌をピンク色で示した。

3. 好中性 *Bacillus* 属細菌と好アルカリ性 *Bacillus* 属細菌で中性環境での Na⁺親和性に関与すると考えられるアミノ酸残基の置換変異の導入

MotP サブユニットの 3 番目の膜貫通領域内で高度に保存されていた好中性 *Bacillus* 属細菌のリジン残基(K)と好アルカリ性 *Bacillus* 属細菌のグルタミン残基(Q)に対して置換変異株を構築し、運動性試験を行った。好中性 *Bacillus* 属細菌は枯草菌の MotP サブユニットの 175 番目のリジン残基をグルタミン残基(BSPS-PK175Q)に置換した株を構築した(BSPS-PK175Q 株)。好アルカリ性 *Bacillus* 属細菌では *B. pseudofirmus* OF4、*B. halodurans* C-125 の MotP サブユニットの 176 番目のグルタミン残基をリジン残基(OFPS-PQ176K、C125PS-PQ176K)に置換した(OFPS-PQ176K 株、C125PS-PQ176K 株)を構築した。それぞれの変異株に対して運動性試験を行った(図 4-3、図 4-4)。その結果、枯草菌の BS-K175Q 株は野生型と比較して運動性の減少が見られた。5 mM の NaCl を添加して培地上においても運動性を観察することはできたが、それ以降 NaCl を添加しても運動性の向上を観察することはできなかった(図 4-3)。好アルカリ性 *Bacillus* 属細菌である *B. pseudofirmus* OF4、*B. halodurans* C-125 に対して作製した OFPS-PQ176K 株、C125PS-PQ176K 株の運動性は、OFPS-PQ176K 株においてのみ野生型と比較して運動性の向上を観察することが出来た。OFPS-PQ176K 株の運動性の向上は NaCl を 50 mM 以上添加した時に観察した。C125PS-PQ176K 株は、運動性を観察することができなかった。また、*B. halodurans* C-125 由来の MotPS を発現させた C125PS 株も中性環境での運動性を観察することが出来なかった。この要因としては、*B. halodurans* C-125 は *B. pseudofirmus* OF4 よりもアルカリ性環境での生育に適応しているためであると考えた。

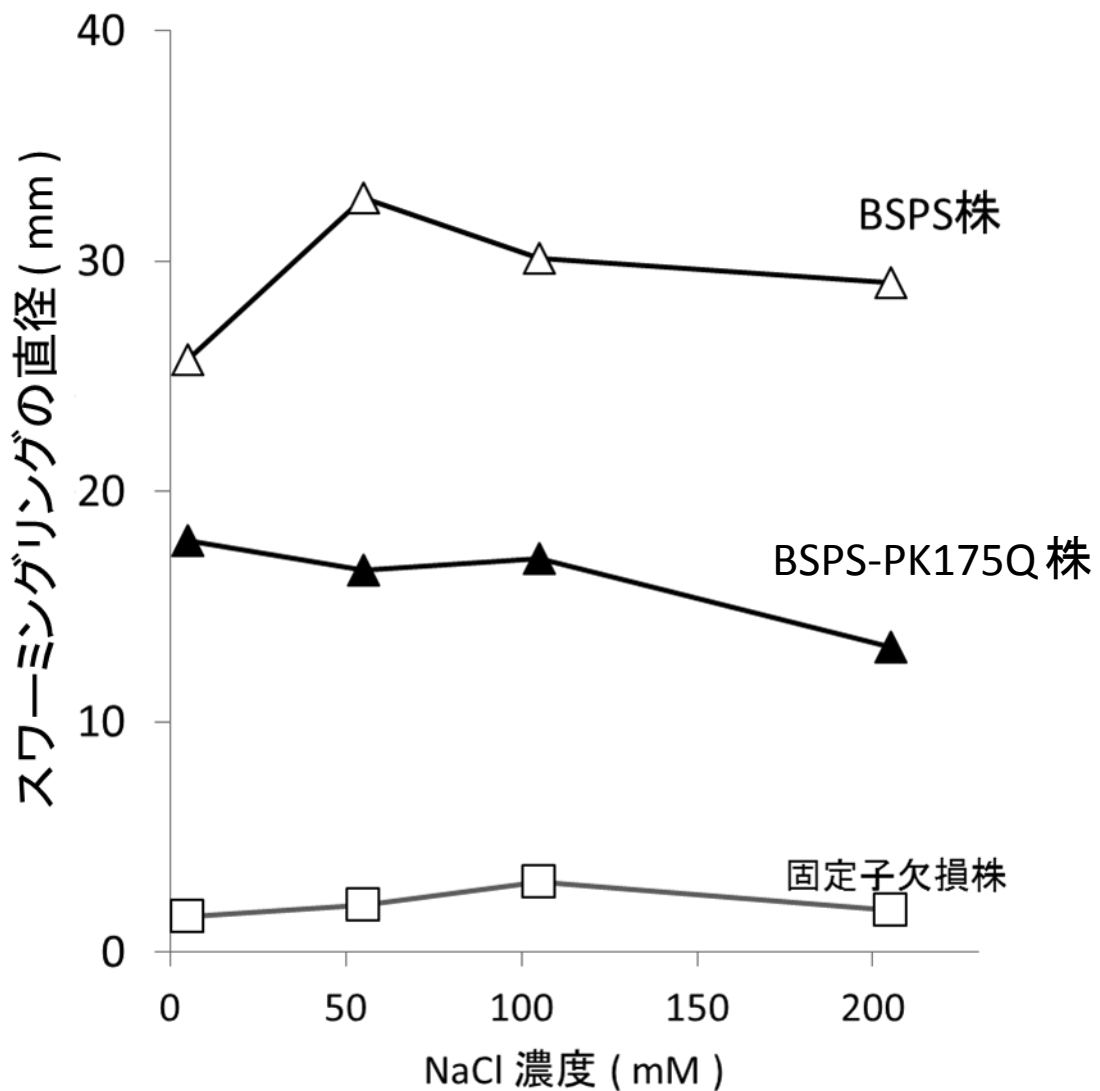


図 4-3. 枯草菌 MotP サブユニットの 175 番目のリジン残基をグルタミン残基に置換した BSPS-PK175Q 株の中性環境下における運動性試験

△ : BSPS、枯草菌由来 MotPS、□:固定子欠損株、枯草菌の固定子欠損株、▲: BSPS-PK175Q、MotP の 175 番目のリジン残基をグルタミン残基に置換した株

0.25%軟寒天培地(pH 7.0)に最終濃度が 2%になるようにキシロースを添加し、NaCl が最終濃度 5 mM、55 mM、105 mM、205 mM になるように添加した。37℃、16 時間の条件で静置培養を行った。

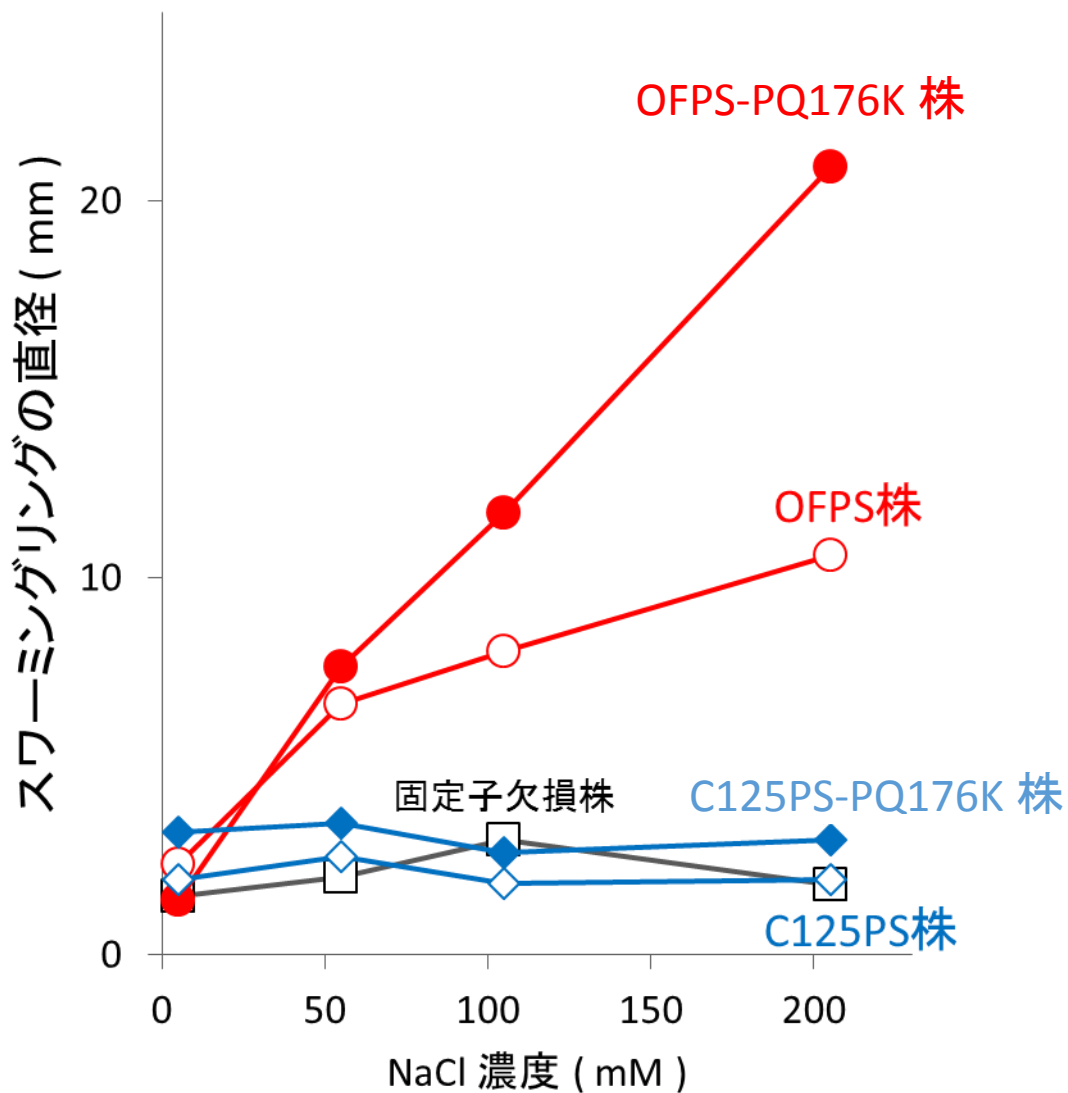


図 4-4. *B. pseudofirmus* OF4、*B. halodurans* C-125 の MotP サブユニットの 176 番目のグルタミン残基をリジン残基に置換した OFPS-PQ176K 株と C125PS-PQ176K 株の中性環境下における運動性試験

□: 固定子欠損株、枯草菌の固定子欠損株、○: OFPS 株、*B. pseudofirmus* OF4 由来 MotPS、◇: C125PS、*B. halodurans* C-125 由来 MotPS、●: OFPS-PQ176K 株、MotP の 176 番目のリジン残基をグルタミン残基に置換した株、◆: C125PS-PQ176K 株、MotP の 176 番目のリジン残基をグルタミン残基に置換した株

0.25%軟寒天培地(pH 7.0)に最終濃度が 2%になるようにキシロースを添加し、NaCl が最終濃度 5 mM、55 mM、105 mM、205 mM になるように添加した。37℃、16 時間の条件で静置培養を行った。

4. キシロース誘導変異型 OFPS 株の中性環境における運動性試験

好中性 *Bacillus* 属細菌と好アルカリ性 *Bacillus* 属細菌の中性環境における Na^+ 親和性に関与するアミノ酸残基や領域を固定子のアミノ酸配列から同定することは出来なかった。

当研究室では、*B. pseudofirmus* OF4 由来の Na^+ 駆動型固定子 MotPS を発現する枯草菌の変異株から自然突然変異による中性環境における運動性復帰株を取得している。この中性環境における運動性復帰株から Na^+ 親和性に関与するアミノ酸残基や領域の同定を試みた。中性環境における運動性復帰株の固定子遺伝子配列を解析した結果、2箇所の変異(RBSの繰り返し配列、MotP-N186D)が同定された。この変異が好アルカリ性 *Bacillus* 属細菌の中性環境における Na^+ 親和性に関与する可能性が考えられたため、運動性復帰株から同定された固定子遺伝子から同定された変異を導入した変異株を構築し、運動性試験を行った。*B. pseudofirmus* OF4 由来の Na^+ 駆動型固定子 MotPS を発現する枯草菌の中性環境での運動性復帰株である OF4PS-7up の *motPS* 遺伝子から同定された RBS の繰り返し配列の変異を導入した M2 株、MotP-N186D の置換変異のみを導入した M3 株(OFPS-PN186D 株)、2箇所の変異を導入した M1 株のキシロース誘導による軟寒天上の運動性試験を行った。その結果、枯草菌の固定子欠損株以外の株は、 Na^+ 濃度依存性の運動性を観察することが出来た(図 4-5)。野生型である *B. pseudofirmus* OF4 由来の Na^+ 駆動型固定子 MotPS を発現させた OFPS 株の運動性と比較して M1 と M3 では運動性の向上を観察することができた。しかし、M2 は、OFPS 株と同様の運動性しか観察できなかった。今回の運動性試験の結果から、中性環境での運動性の復帰に MotP サブユニット 186 番目のアスパラギン残基がアスパラギン酸残基に置換されていた点変異(MotP-N186D)が関与していることが示唆された(図 4-7)。

枯草菌の Na⁺駆動型固定子 MotPS を発現させた BSPS 株は、Na⁺濃度が 5 mM 程度のしか含まれない培地上でも十分な運動性示す(図 4-5)。しかし、運動性試験を行った変異株を含める *B. pseudofirmus* OF4 由来の固定子を導入した株において、Na⁺濃度が 5 mM 程度のしか含まれない培地上で運動性を観察することが出来なかった。これは、枯草菌と *B. pseudofirmus* OF4 のイオンチャネルである固定子の共役イオンである Na⁺に対する親和性の違いによると考えられる。

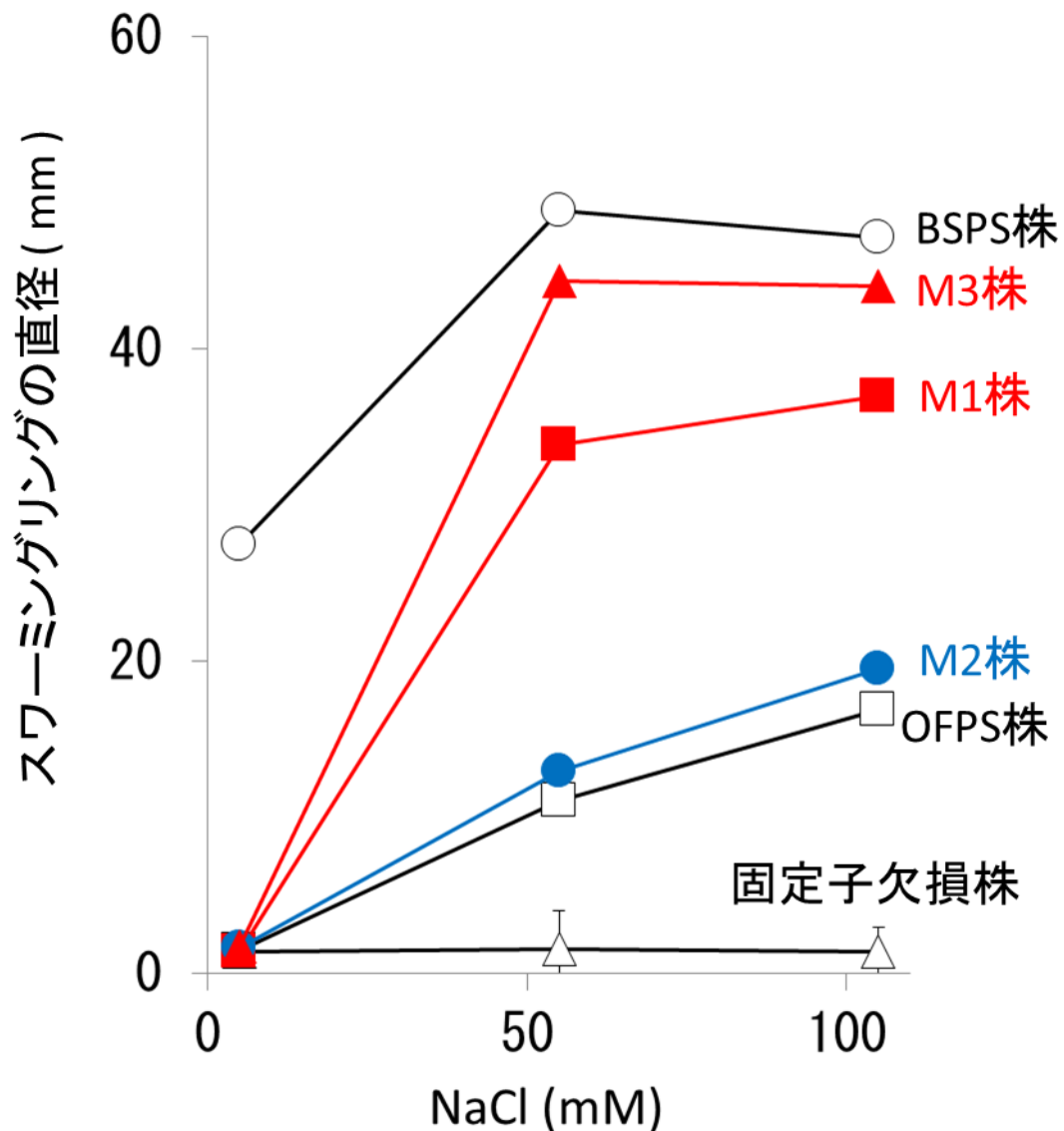


図 4-5. キシロース誘導変異型 OF-MotPS 株の中性環境下における運動性試験
 ○ : BSPS、枯草菌由来 MotPS、□ : OFPS、*B. pseudofirmus* OF4 由来 MotPS、△ :
 ΔABΔPS、枯草菌固定子欠損株、■ : M1、OF4PS-7up の *motPS* 遺伝子から同定さ
 れた RBS の繰り返し配列の変異と MotP の 186 番目のアスパラギン残基がアス
 パラギン酸残基になった置換変異である 2 箇所の変異を導入した株、● : M2、
 RBS の繰り返し配列の変異のみを導入した株、▲ : M3、MotP の 186 番目のアス
 パラギン残基がアスパラギン酸残基への置換変異のみを導入した株

0.25%軟寒天培地(pH 7.0)に最終濃度が 2%になるようにキシロースを添加し、
 NaCl が最終濃度 5 mM、55 mM、105 mM になるように添加した。37℃、16 時間
 の条件で静置培養を行った。

5. キシロース誘導変異型 OFPS 株の中性環境下における膜画分における固定子の発現量の検討

B. pseudofirmus OF4 由来の Na⁺駆動型固定子 MotPS に変異を導入した OFPS 株と M1 株、M2 株、M3 株のキシロース誘導による固定子の膜画分における発現量の検討をウエスタンブロット解析を用いて行った。その結果、野生型である OFPS 株と比較して変異株の MotP サブユニットの膜画分における発現量は 1.7 から 2.0 倍程度を観察することが出来た(図 4-6)。この結果から、M1 株と M2 株に関しては RBS の繰り返し配列の影響によって約 2 倍の MotP サブユニットの発現量を観察することが出来たことが示唆された。M3 株に関しては、MotP-N186D の変異によって野生株よりも宿主内で機能的であるために膜画分に固定子が安定的に発現出来たのではないかと推察した。

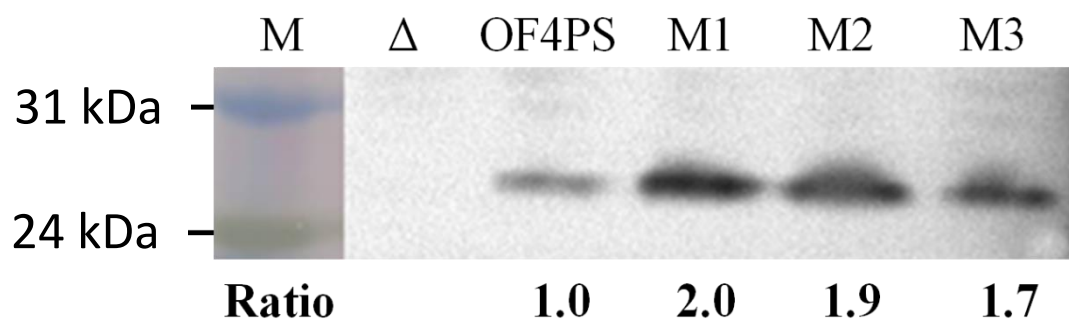


図 4-6. キシロース誘導株のウエスタンブロット解析による膜画分での固定子タンパクの発現量の検討

M : BLUE Star Prestained Protein-Ladder (日本ジェネティクス)、OF4PS : *B. pseudofirmus* OF4 由来 MotPS、Δ: 枯草菌の固定子欠損株、M1 : OF4PS-7up の *motPS* 遺伝子から同定された 2 箇所の変異を導入した株、M2 : RBS の繰り返し配列の変異を導入した株、M3 : OFPS-PN186D の置換変異のみを導入した株

ウエスタンブロット解析による膜画分での固定子タンパクの発現量の検討を抗 OF-MotP ポリクローナル抗体を用いて行った。各サンプルは 30 μg 泳動した。各レーンにサンプル名と野生株を 1.0 とした時の割合(Ratio)を記載した。

6. 好アルカリ性 *Bacillus* 属細菌の中性環境における運動性復帰に関与すると考えられる置換変異の導入

B. pseudofirmus OF4 由来の Na⁺駆動型固定子 MotPS を発現させた OFPS 株の中性環境での運動性復帰に関与していることが示唆された MotP サブユニットの MotP-N186D は、他の好アルカリ性 *Bacillus* 属細菌が持つ MotPS の中性環境における運動性の向上に関与するのか検討した。*B. pseudofirmus* OF4 の近縁種である *B. halodurans* C-125 由来の MotPS の MotP サブユニットの 187 番目のアスパラギン残基をアスパラギン酸残基(C125PS-PN187D)に置換した変異株(C125PS-PN187D 株)を構築し、pH 7.0 に調整した軟寒天培地上における運動性試験を行った。その結果、*B. halodurans* C-125 由来の MotPS を導入した C125PS 株は運動性を観察することができなかった。変異を導入した C125PS-PN187D 株は Na⁺濃度に依存した運動性を観察することができた(図 4-8)。

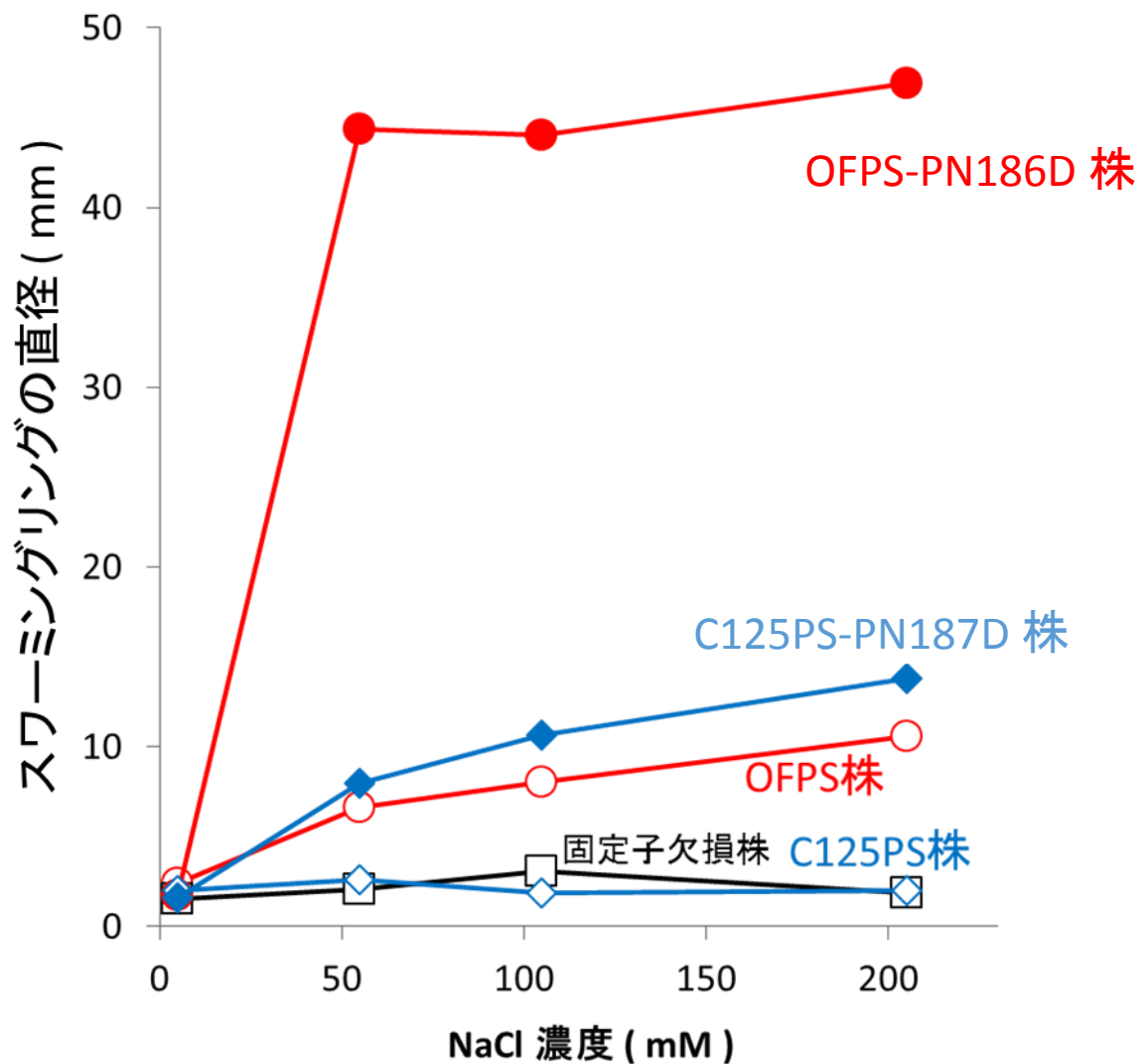


図 4-8. 好アルカリ性 *Bacillus* 属細菌の中性環境における運動性復帰に関与すると考えられるアミノ酸残基の置換変異株による中性環境での運動性試験

□: 固定子欠損株、枯草菌の固定子欠損株、○: OFPS 株、*B. pseudofirmus* OF4 由来 MotPS、◇: C125PS、*B. halodurans* C-125 由来 MotPS、●: OFPS-PN186D 株、MotP の 186 番目のアスパラギン残基をアスパラギン酸残基に置換した株(M3 株)、◆: C125PS-PN187D 株、MotP の 187 番目のアスパラギン残基をアスパラギン酸残基に置換した株

0.25%軟寒天培地(pH 7.0)に最終濃度が 2%になるようにキシロースを添加し、NaCl が最終濃度 5 mM、55 mM、105 mM、205 mM になるように添加した。37℃、16 時間の条件で静置培養を行った。

7. M3 株を用いた低 Na^+ 濃度の中性環境下における運動性向上株(M3up)の取得と解析

MotP の 186 番目のアスパラギン残基が中性環境における運動性復帰に関与していることが示唆された。M3 株の運動性の向上は Na^+ の存在下でのみ観察された。この結果は、M3 株の変異 MotP-N186D は Na^+ 親和性ではなく、 Na^+ の流入調節に関与していることを示唆した。

本研究では、中性環境における低 Na^+ 濃度の条件下運動性向上株の取得を試みた。その結果、複数の運動性向上株(M3up)の取得に成功した(図 4-9)。取得した運動性向上株の *motPS* 遺伝子配列をシーケンス解析により変異箇所の同定を試みた。その結果、5 箇所の変異を同定することが出来た。同定された変異は全て *motS* 遺伝内で置換変異として同定された。MotS サブユニットの 37 番目のセリン残基がスレオニン残基(MotS-S37T)、47 番目のイソロイシン残基がスレオニン残基(MotS-I47T)、48 番目のセリン残基がプロリン残基(MotS-S48P)、50 番目のセリン残基がプロリン残基(MotS-S50P)、130 番目のバリン残基がアラニン残基(MotS-V130A)にそれぞれ置換された変異を同定した。同定された変異が MotS サブユニットのどの部位に位置するか検証した(図 4-10)。その結果、37 番目のセリン残基は膜貫通領域、47 番目のスレオニン、48 番目のセリン、50 番目のセリンは固定子がイオンチャネルとして不活性化している時に共役イオンの流入を防ぐのに重要だと考えられている Plug 領域⁽⁶²⁾、130 番目のバリンは MotS サブユニットの C 末端領域の基部体に固定子が組み込まれる時にペプチドグリカンと結合するために大きな構造変化を必要とすると考えられている領域⁽⁵⁴⁾に存在していた(図 4-10)。

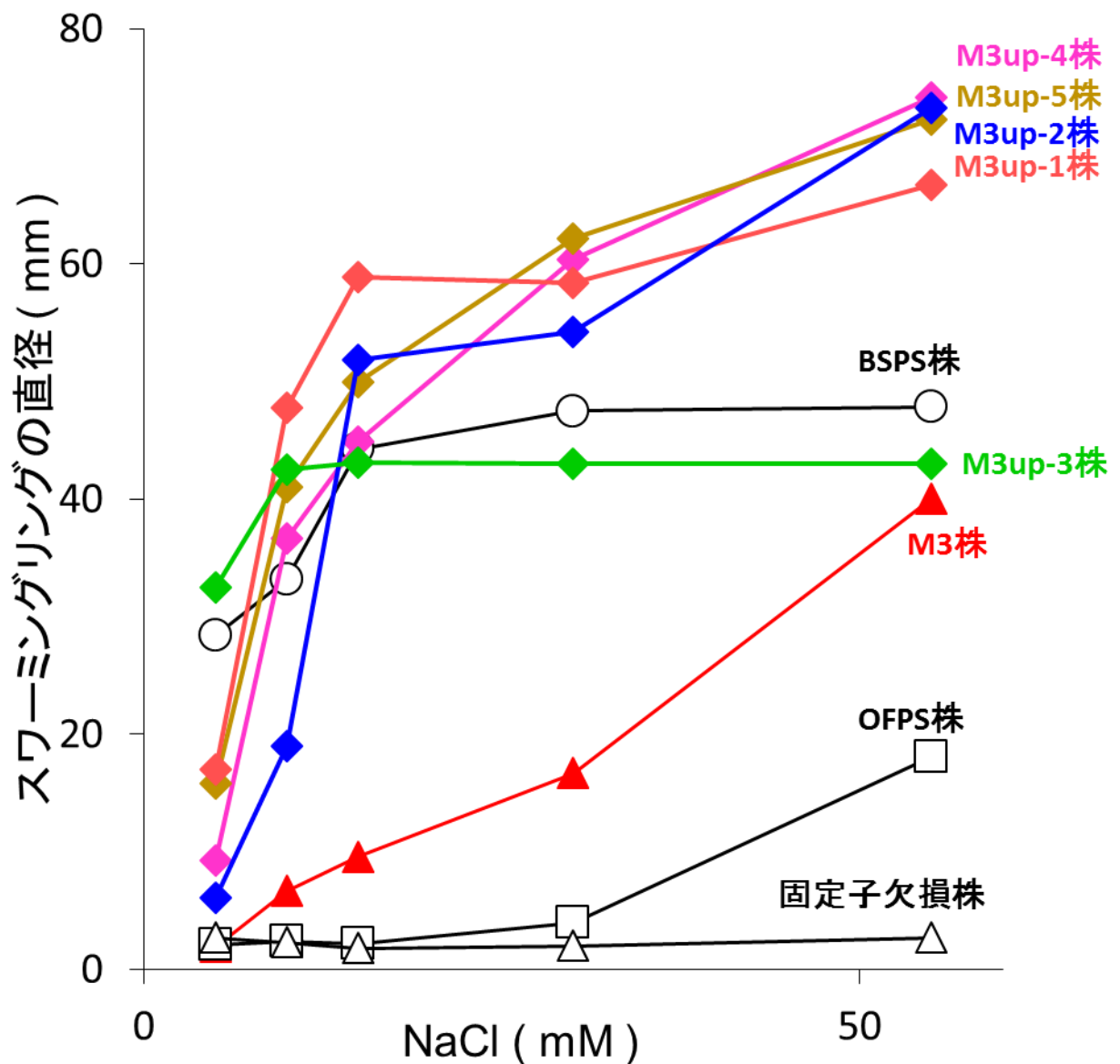


図 4-9. M3 を用いた低 Na^+ 濃度下における運動性向上株の運動性試験

○ : BSPS、枯草菌由来 MotPS、□ : OFPS、*B. pseudofirmus* OF4 由来 MotPS、△ : $\Delta\text{AB}\Delta\text{PS}$ 、枯草菌固定子欠損株、▲ : M3、MotP の 186 番目のアスパラギン残基がアスパラギン酸残基への置換変異のみを導入した株、◆ : M3up、M3 を用いた低 Na^+ 濃度下における運動性向上株

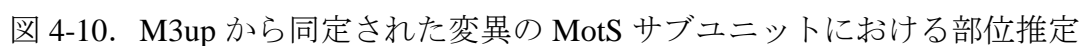
0.25%軟寒天培地(pH 7.0)に最終濃度が 2%になるようにキシロースを添加し、NaCl が最終濃度 5 mM、10 mM、5 mM、30 mM、55 mM になるように添加した。37°C、16 時間の条件で静置培養を行った。

A

OF4_MotS 1 -----MKRRRRQKEKGAPKWMVTFSDMTLILVFFILLFSMSVLDQKFRAISESFQQRCVFEEFPSAIEFENP
C125_MotS 1 -----MKRRKRQPEKGAPRWMVTFSDLMTLILVFFILLFSMSVLDQKFRAIAESFQQRCVFEFLPSAIDFESP
BAL_MotS 1 -----MLRRRKQVPEKGAPKWMVTFSDLMTLILVFFVMLFSMSEIDNQRFRAMADSNQRCVDFDMPSMIEFEHP
BCE_MotS 1 -----MIRRRRQGNTTEKGAPKWMVTFSDLMTLILVFFVLLFSMSVLDQKFQAVAESFQDRALFEFYPSLIIPFDNP
BSE_MotS 1 -----MNRKKKQGPKGAPKWMVTFSDLMTLILVFFILLFSMSVLDANRFEAIAESFQERAI FDFYPSLIIPFENP
BS_MotS 1 MKLRRRERFERRNGSGKNSQSSSSWMTFTDLITLILVFFILLFSMSQIDLQKFKA AVDSIQ-KEGNGLQPDQT SIEK-

. : :::: ***** * :***** :***** * : * * * * : : : *

B



M3up から同定された変異箇所は MotS-S37T、MotS-I47T、MotS-S48P、MotS-S50P、各色で示した。

137

8. 低 Na⁺濃度の中性環境下における運動性向上株(M3up)の相補株の構築と運動性試験

中性環境下における低 Na⁺濃度の条件下で運動性向上株を取得した。取得した運動性向上株(M3up)により変異箇所の解析を行った。運動性向上株で同定された変異を導入した変異株(MotS-S37T 株、MotS-I47T 株、MotS-S48P 株、MotS-S50P 株、MotS-V130A 株)の構築を行った。構築した変異株の運動性試験の結果、低 Na⁺濃度下における運動性は親株である M3 株よりも向上していた。しかし、M3up 株のような低 Na⁺濃度における運動性の向上は観察できなかった(図 4-11)。この要因としては、M3up 株は染色体上に固定子遺伝子以外の変異があり、その変異が運動性の向上に関与していることが考えられる。

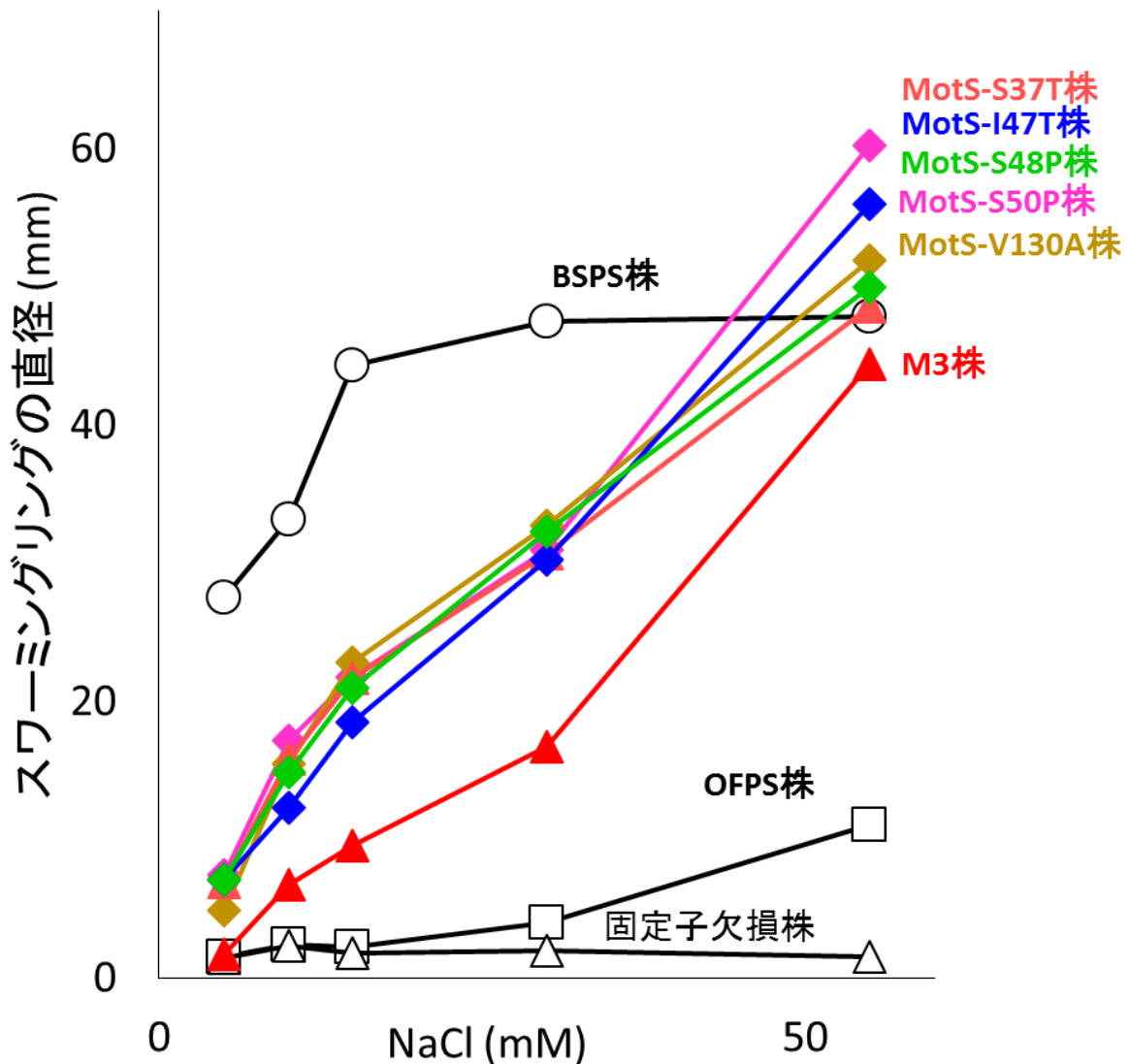


図 4-11. M3up 株から同定された変異を導入した変異株を用いた低 Na^+ 濃度下における運動性向上株の運動性試験

○ : BSPS、枯草菌由来 MotPS、□ : OFPS、*B. pseudofirmus* OF4 由来 MotPS、△ : $\Delta\text{AB}\Delta\text{PS}$ 、枯草菌固定子欠損株、▲ : M3、MotP の 186 番目のアスパラギン残基がアスパラギン酸残基への置換変異のみを導入した株、◆ : M3up 相補株、MotP-N186D と各同定した変異 **MotS-S37T**、**MotS-I47T**、**MotS-S48P**、**MotS-S50P**、**MotS-V130A** を導入した相補株

0.25%軟寒天培地(pH 7.0)に最終濃度が 2%になるようにキシロースを添加し、NaCl が最終濃度 5 mM、10 mM、5 mM、30 mM、55 mM になるように添加した。37℃、16 時間の条件で静置培養を行った。

9. *B. pseudofirmus* OF4 と枯草菌の固定子遺伝子内の Plug 領域置換変異株の運動性試験

M3 株から取得した M3up 株の *motPS* 遺伝子配列から 5 箇所の変異を同定することが出来た。同定された 5 箇所のうち 3 箇所は、イオンチャネルとして不活性化している時に共役イオンの流入を防ぐのに重要だと考えられている Plug 領域⁽⁶²⁾(図 4-10)であった。この結果は、固定子の Plug 領域が Na⁺の流入調節に参与している可能性を示唆したため、好中性 *Bacillus* 属細菌である枯草菌と好アルカリ性 *Bacillus* 属細菌である *B. pseudofirmus* OF4 の MotS サブユニット内の Plug 領域を置換した変異株を構築し運動性試験を行った。その結果、枯草菌の固定子に *B. pseudofirmus* OF4 の Plug 領域を導入した BS+OF-Plug 株は野生型である BPS 株と比較して運動性の低下を示した。*B. pseudofirmus* OF4 の固定子に枯草菌の Plug 領域を導入した OF+BS-Plug 株は野生型である OFPS 株と比較して 5 mM の NaCl を添加しても運動性の向上を観察することができなかったが、10 mM 以上の NaCl を添加すると運動性の向上を観察することができた(図 4-12)。これらの結果は、固定子の Plug 領域が Na⁺の流入調節に参与している可能性を示唆していた。

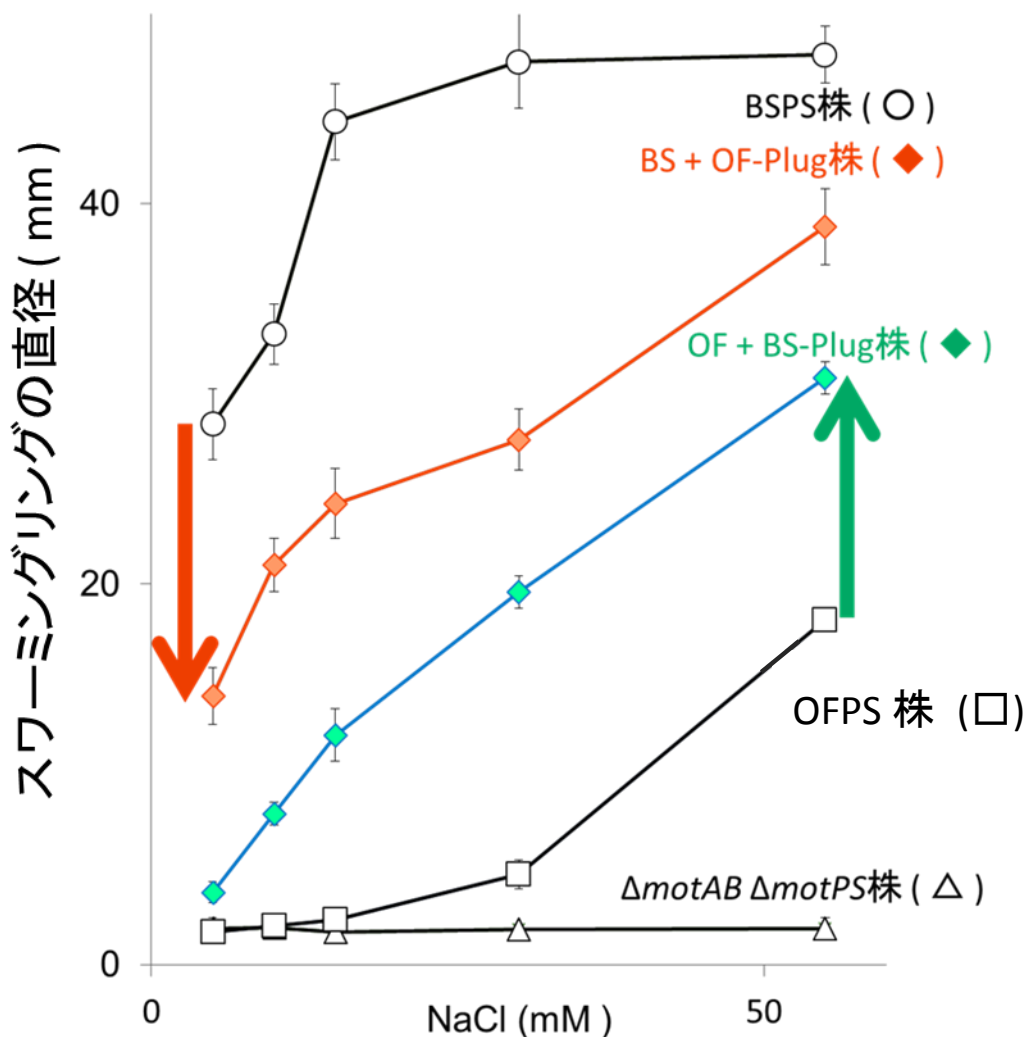


図 4-12. *B. pseudofirmus* OF4 と枯草菌の固定子遺伝子内の Plug 領域置換変異株の運動性試験

○ : BSPS、枯草菌由来 MotPS、□ : OFPS、*B. pseudofirmus* OF4 由来 MotPS、△ : ΔABΔPS、枯草菌固定子欠損株、◆ : BS+OF-Plug 株、枯草菌の固定子に *B. pseudofirmus* OF4 の Plug 領域を導入した株、◆ : OF+BS-Plug 株、*B. pseudofirmus* OF4 の固定子に枯草菌の Plug 領域を導入した株

オレンジ色の矢印は BSPS 株と比較した BS+OF-Plug 株の運動性の低下を示している。青緑の矢印は OFPS 株と比較した OF+BS-Plug 株の運動性の向上を示している。

0.25%軟寒天培地(pH 7.0)に最終濃度が 2%になるようにキシロースを添加し、NaCl が最終濃度 5 mM、10 mM、5 mM、30 mM、55 mM になるように添加した。37℃、16 時間の条件で静置培養を行った。

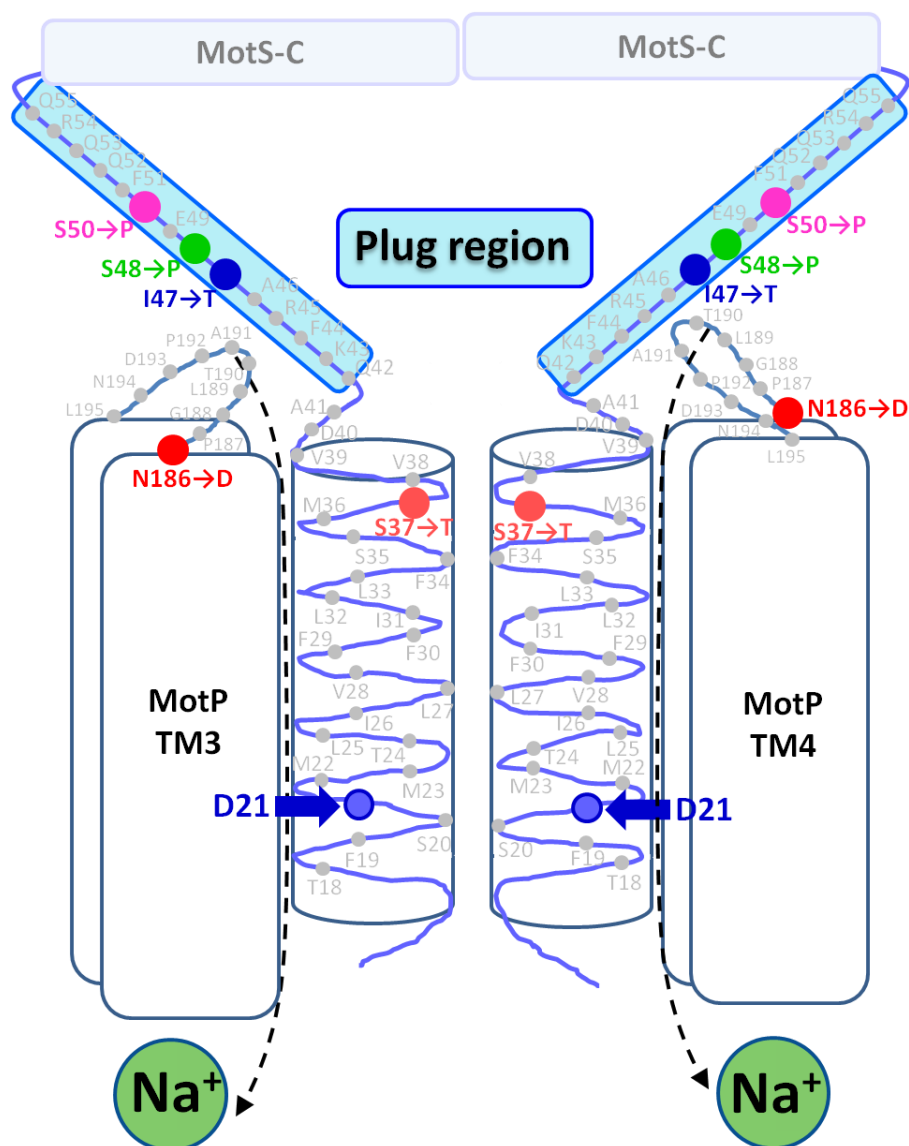


図 4-13. M3up において同定された変異箇所の MotPS 複合体模式図

B. pseudofirmus OF4 由来 Na⁺駆動型固定子 MotPS の複合体模式図における変異同定箇所を○で示した。MotP-N186D は赤色、MotS-S37T はオレンジ色、MotS-I47T は青色、MotS-S48P は緑色、MotS-S50P はピンク色で示した。MotS サブユニットのイオン結合部位と考えられる 21 番目のアスパラギン酸残基(D21)を水色で示した。Na⁺の流入経路の予測を点線で示した。空色で塗りつぶした領域は、Plug 領域を示している。

第四節 考察

好アルカリ性細菌である *B. pseudofirmus* OF4 は、中性である pH 7.0 では 100 mM 以上の高濃度の Na^+ を運動性に要求する⁽⁵⁰⁾。しかし、好中性細菌である枯草菌は中性環境でも 5 mM 程度の低 Na^+ 濃度でも運動性を示す⁽¹⁸⁾。このことから、枯草菌と *B. pseudofirmus* OF4 のべん毛モーター Na^+ 駆動型固定子 MotP では中性環境での Na^+ 親和性が異なる可能性が考えられた。

好中性 *Bacillus* 属細菌の枯草菌と好アルカリ性 *Bacillus* 属細菌の *B. pseudofirmus* OF4 と *B. halodurans* C-125 に着目し、中性環境における Na^+ 親和性に関与すると考えられるアミノ酸残基や領域の同定を試みた。その結果、MotP サブユニットの 3 番目の膜貫通領域内で好中性 *Bacillus* 属細菌と好アルカリ性 *Bacillus* 属細菌で保存性の異なるアミノ酸残基が同定された。好中性 *Bacillus* 属ではリジン残基(K)が、好アルカリ性 *Bacillus* 属細菌ではグルタミン残基(Q)が高度に保存されていた(図 4-2)。これらアミノ酸残基に対して構築した置換変異株 BS-K175Q 株、OF-Q176K 株、C125-Q176K 株の運動性試験の結果、この部位は Na^+ 親和性には関与していないことが示唆された(図 4-3、図 4-4)。

当研究室では、*B. pseudofirmus* OF4 由来の固定子を導入した OF4PS 株から自然突然変異によって中性環境での運動性向上株を取得した。中性環境において取得された運動性復帰株(OF4PS-7up)から同定された変異を導入した変異株の構築と解析を行った。その結果、OF4PS-7up の MotP サブユニットの 186 番目のアスパラギン残基がアスパラギン酸残基(MotP-N186D)に置換されたことにより中性環境での運動性が復帰したことが示唆された。MotP-N186 は MotP サブユニットの 3 番目と 4 番目の膜貫通領域の間のペリプラズム側のループの 3 番目の膜貫通領域の直前に位置していると推定された(図 4-7)。この位置は共役イオン流

入ポアの入り口近傍であることから、アスパラギン残基がマイナスの電荷を持つアスパラギン酸残基に置換されたことによって、プラスの電荷である共役イオンを取り込みやすくなったのではないかと推測された。また、MotP-N186Dを導入した株 M3 から取得した運動性向上株 M3up の *motPS* 遺伝子内の変異箇所は全て *motS* 遺伝子内で同定された。MotS サブユニットの 37 番目のセリン残基がスレオニン残基(MotS-S37T)、47 番目のイソロイシン残基がスレオニン残基(MotS-I47T)、48 番目のセリン残基がプロリン残基(MotS-S48P)、50 番目のセリン残基がプロリン残基(MotS-S50P)、130 番目のバリン残基がアラニン残基(MotS-V130A)にそれぞれ置換されていた。同定された変異が MotS サブユニットの 37 番目のセリン残基は膜貫通領域、47 番目のスレオニン残基、48 番目のセリン残基、50 番目のセリン残基は固定子の不活性化時に共役のイオンの流入の制御に重要な Plug 領域⁽⁵⁰⁾、130 番目のバリン残基は基部体に固定子を組み込むために重要な領域⁽⁴⁶⁾に存在していた(図 4-5)。しかし、これらの変異を導入した変異株は運動性向上株の運動性を相補することは出来なかった。この結果は、今回同定した変異以外に染色体上に変異が必要であることを示唆している。しかし、低 Na⁺濃度下において少しではあるが野生株である BSOF よりも運動性を示していることから、低 Na⁺濃度下における運動性の向上に関与していると推測した。

サルモネラ菌の H⁺駆動型固定子 MotAB の MotB サブユニットに存在する Plug 領域は、固定子がイオンチャネルとしての機能を不活性化するために重要な領域だと報告されている⁽⁵⁰⁾。固定子は流動的に基部体への出入りを行っている。そのため、細胞膜中には多くの固定子が存在している。しかし、固定子は基部体に組み込まれてからイオンチャネルとして機能するので基部体に組み込まれていない時はイオンを流入していない。基部体に組み込まれていない時にイオンの流入を防いでいるのが Plug 領域であると考えられている⁽⁵⁰⁾。Plug 領域を欠損

させた固定子を細胞内で発現させると共役イオンの流入制御ができないため細胞内外のイオン濃度の均衡が保てないため、生育に影響を生じる⁽⁵⁰⁾。しかし、*V. alginolyticus* の Na⁺駆動型固定子 PomAB の PomB サブユニットの推定共役イオン結合部位であるアスパラギン酸残基(D24)をアスパラギン残基に置換した(D24N)固定子はイオンチャネルとして機能できない。そのため、Plug 領域が欠損していても細胞内にイオンの流入が起こらないので野生型と同等の生育を示す⁽⁵¹⁾。これらのことから、低 Na⁺濃度下で取得された運動性向上株の運動性の向上に同定された Plug 領域の変異が関与していると推測した。また、膜貫通領域や C 末端領域で同定された変異は固定子の構造が変化したことにより引き起こされた二次的な影響であると推測した。

今回得られた結果から、中性環境における *B. pseudofirmus* OF4 の運動性の低下の原因と考えられる Na⁺駆動型固定子 MotPS の Na⁺の流入制御にイオン流入ポア付近に存在するアミノ酸残基(N186)や Plug 領域が関与していることを推測することが出来た。

固定子のイオン流入調節機構は固定子のイオンチャネルとしての機能において重要な役割を果たしている。そのため、今後より詳細な解析が必要となる。

第五章 総括

本研究では、*Bacillus* 属細菌である枯草菌の H^+ 駆動型固定子 MotAB と Na^+ 駆動型固定子 MotPS または *B. pseudofirmus* OF4 の Na^+ 駆動型固定子 MotPS を研究対象とし、*Bacillus* 属細菌のべん毛モーターの固定子に着目してべん毛モーターの駆動力の発生メカニズムや固定子の共役イオン流入機構や制御機構を解明することを目的とした。

第一節 枯草菌べん毛モーター H^+ 駆動型固定子 MotAB と Na^+ 駆動型固定子 MotPS の回転駆動力の発生に重要なアミノ酸残基の特定と解析について

枯草菌が持つ H^+ 駆動型固定子 MotAB と Na^+ 駆動型固定子 MotPS に着目し、MotA サブユニットと MotP サブユニットの 2 番目と 3 番目の膜貫通領域の間に存在する細胞質内ループ内の荷電アミノ酸残基に置換導入変異体を作製し、解析を行った。

枯草菌の細胞質内ループのアライメント結果から、このループ内に存在する荷電アミノ酸残基の中で、MotA サブユニットでは、90 番目のアルギニン残基と 98 番目のグルタミン酸残基の保存性が比較的高いことが分かった。MotP サブユニットでは、94 番目のアルギニン残基が最も保存性が高く、102 番目のアスパラギン酸残基は他の細菌において同じ電荷を持つグルタミン酸残基が保存されていることが分かった。それぞれのサブユニットに対して、保存性の高い 2 つの荷電アミノ酸残基を中心として周囲に存在する荷電アミノ酸残基を選抜し、置換変異導入を行った。

作製した変異株に対して、運動性試験、固定子の膜面分における発現量の検討、変異株のドミナントネガティブ効果の検討などを行った。その結果、MotA サブユニットと MotP サブユニットの 2 番目と 3 番目の膜貫通領域の間に存在する細胞質内ループ内の荷電アミノ酸残基の特性を把握することができた。

MotA サブユニットの E98 と MotP サブユニットの R94、K95 はモーターの回転に重要であると考えられた。これらの荷電アミノ酸残基に対する変異導入によって運動性の低下、ドミナントネガティブ効果の有効性を観察することができた。R94A の運動性は固定子の発現量の低下と共に減少した。また、R94 において逆の荷電アミノ酸残基を導入した R94E の運動性は顕著に低下していた。しかし、固定子の発現量は野生型 BS-PS の約半分程度保持していた。これらのことから、MotA サブユニットの E98 と MotP サブユニットの R94、K95 は、特にモーターの回転に重要な荷電アミノ酸残基であることが示唆された。また、MotA サブユニットの E102 と MotP サブユニットの E107 は固定子が基部体に取り込まれるために重要な荷電アミノ酸残基であることが示唆された。

MotA サブユニットの R90、E92 と MotP サブユニットの D91、D102 は変異導入によって顕著な運動性の低下を引き起こした。しかし、この運動性の低下は固定子の発現量の低下によって引き起こされたものであると判断した。このことから、MotA サブユニットの R90、E92 と MotP サブユニットの D91、D102 は固定子構造の安定化に重要であることが示唆された。

これらの結果から、枯草菌べん毛モーターの回転駆動力発生機構は、H⁺駆動型固定子 MotAB または Na⁺駆動型固定子 MotPS と 1 つの回転子構成タンパク質 FliG 間における静電的相互作用に寄与する可能性が示唆された。枯草菌べん毛モーターの回転に重要と特定した荷電アミノ酸残基の電荷が、H⁺駆動型はマイナス(E98)、Na⁺駆動型はプラス(R94、K95)であった(図 5-1)。このことから、

1つの回転子 FliG に対して 2 種類の固定子を持つ枯草菌べん毛モーターは、 H^+ 駆動型と Na^+ 駆動型で相互作用部位を区別している可能性が示唆された。

また、枯草菌の固定子と回転子間の静電的相互作用様式は、 H^+ 駆動型 MotA サブユニット、 Na^+ 駆動型 MotP サブユニット共に大腸菌やサルモネラ菌の H^+ 駆動型 MotA サブユニットと FliG 間における静電的相互作用様式に類似していることが推測された。

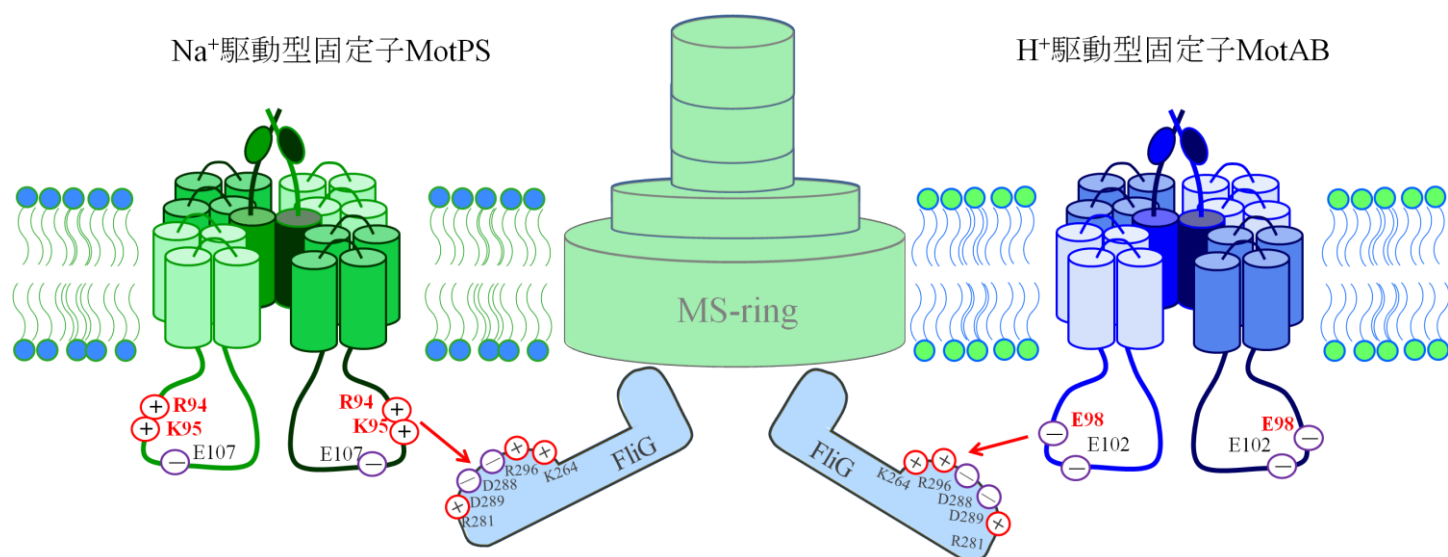


図 5-1. 枯草菌べん毛モーターの固定子において回転機構に関与が考えられる荷電アミノ酸残基と回転子構成タンパク質 FliG の C 末端領域の荷電アミノ酸残基

枯草菌は 1 つ回転子に対して 2 種類の固定子を持つ。本研究の結果から、べん毛モーターの回転駆動力発生機構に関与すると示唆された荷電アミノ酸残基を図中に示した。直接的にべん毛モーターの回転駆動力の発生に重要な荷電アミノ酸残基である H⁺駆動型 MotA サブユニットの E98 と Na⁺駆動型 MotP サブユニットの R94 と K95 を赤字で示した。また、固定子が基部体に取り込まれるために重要な荷電アミノ酸残基である H⁺駆動型 MotA サブユニットの E102 と Na⁺駆動型 MotP サブユニットの E107 を黒字で示した。回転子構成タンパク質 FliG の C 末端領域の荷電アミノ酸残基と予測される静電的相互作用を赤色矢印で示した。

第二節 枯草菌べん毛モーター固定子におけるイオン流入経路に関与するアミノ酸残基の特定と解析について

枯草菌が持つ H^+ 駆動型固定子 MotAB と Na^+ 駆動型固定子 MotPS の MotB サブユニットの 24 番目のアスパラギン酸残基と MotS サブユニットの 30 番目のアスパラギン酸残基は共役イオン結合部位であると推定されていた。この共役イオン結合部位に着目し、部位特異的置換変異体を作製した。また、MotB-D24E と MotS-D30E から運動性向上株を取得した。取得した運動性向上株 MotB-D24Eup と MotS-D30Eup の変異箇所を固定子遺伝子内に同定した。次に、運動性向上株から同定された変異箇所が運動性向上に関与しているのか解明した。

大腸菌の MotB サブユニットでは、固定子のイオン結合部位として 32 番目のアスパラギン酸残基が提唱されている⁽¹³⁾。MotB サブユニットの 32 番目のアスパラギン酸残基の位置は、他の細菌においても高度に保存されている。枯草菌の推定共役イオン結合部位の部位特異的置換変異体は MotS-D30E を除いて運動性を喪失した。これらの結果から、枯草菌固定子の MotB サブユニットの 24 番目と MotS サブユニットの 30 番目のアスパラギン酸残基も共役イオン結合部位であると推定した。また、運動性向上株から同定した変異箇所は大変興味深い箇所に存在していた。MotB-D24Eup から同定された MotB-T181A は、MotB サブユニットの C 末端領域に存在する PGB モチーフに存在していた(図 3-4A)。大腸菌では、MotB-T181 の位置するアミノ酸残基は固定子の複合体形成に重要であることが報告されている。また、MotS-D30Eup から同定された MotP-L172P は、共役イオンの流入経路の裏側に位置すると推定された(図 3-4D)。このことから、MotP サブユニットの 172 番目のロイシン残基がプロリン残基に置換したことにより共役イオンの流入経路の構造が変化し、MotS-D30E と Na^+ が結合しやすくなり、

運動性が回復したと推測した(図 5-2(F))。今回、同定された変異は、2 箇所とも固定子の構造に関与していると考えられる。このことから、イオンチャネルである固定子の共役イオンの流入経路は固定子の構造に依存的だと考えた。しかし、現在、固定子の立体構造は MotB の親水性領域である C 末端側のみが明らかとなっている。そのため、今回同定された変異箇所が固定子の立体構造にどのように影響するか証明するには時間を要すると考えられる。今後、固定子複合体の立体構造が明らかになれば、今回同定した変異箇所と共役イオンの流入経路との関係をより詳細に明らかにできると考えられる。

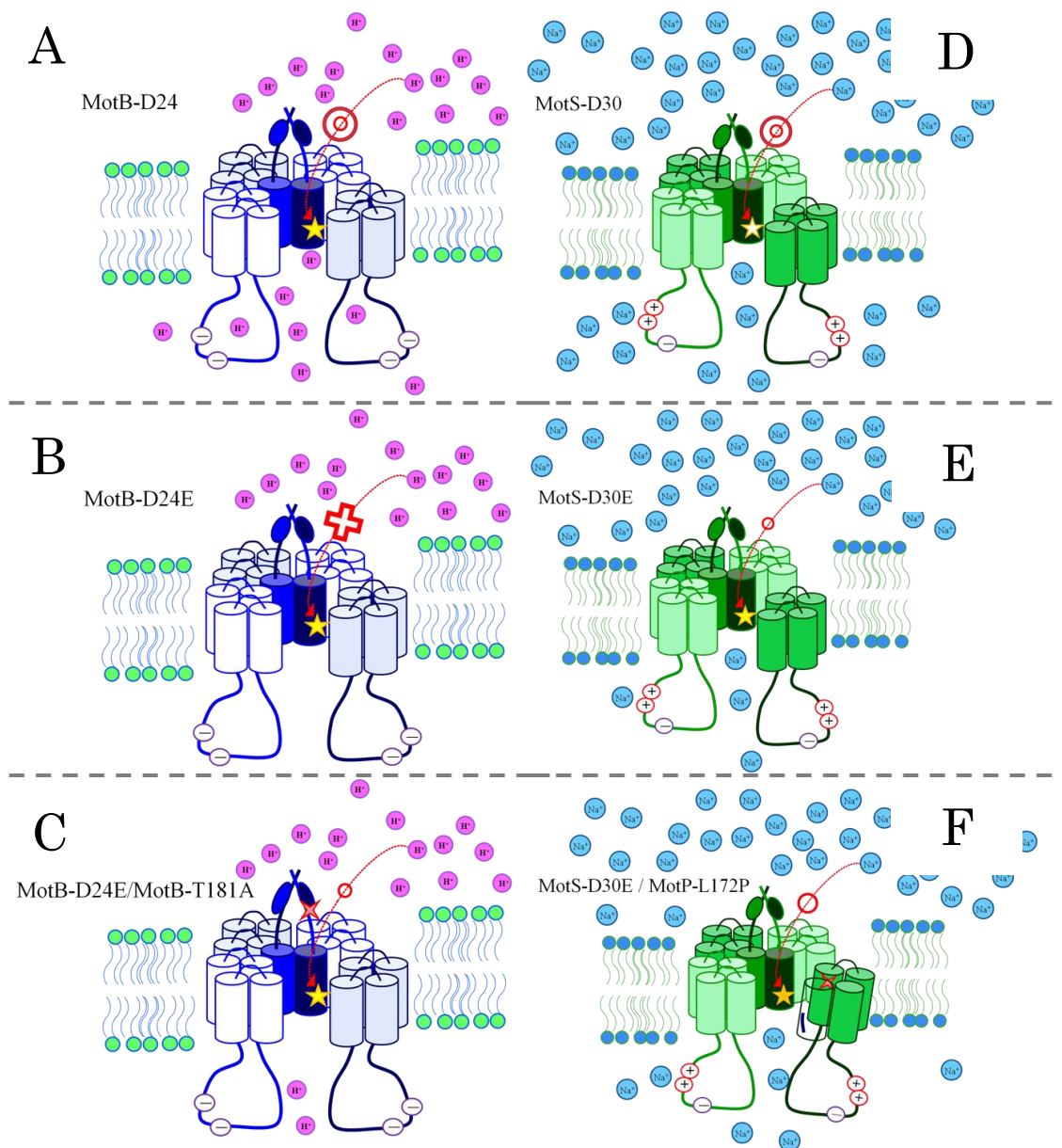


図 5-2. 枯草菌べん毛モーター固定子の野生型、推定共役イオン結合部位へのグルタミン酸残基置換変異導入を行った固定子、グルタミン酸置換運動性向上株の固定子の模式図

A: 野生型 H⁺駆動型固定子 MotAB、B: MotB-D24E、C: MotB-D24A / MotB-T181A、D: 野生型 Na⁺駆動型固定子 MotPS、E: MotS-D30E、F: MotS-D30 / MotP-L172P 固定子としての機能を通常時(⊙)、低下している時(○)、機能しない時(⊗)を示した。

模式図は、MotAB は pH 7.0、MotPS は pH 8.0 で NaCl を 200 mM 添加した場合の固定子としての機能を示している。

第三節 枯草菌と好アルカリ性細菌 *Bacillus pseudofirmus* OF4 の Na⁺駆動型固定子 MotPS の中性環境における Na⁺親和性の差異の解明について

好アルカリ性菌 *B. pseudofirmus* OF4 のべん毛モーターの Na⁺駆動型固定子 MotPS は、アルカリ性環境である pH が 8.0 以上環境では Na⁺濃度に依存した運動性を示すが、中性環境である pH 7.0 では 100 mM の Na⁺を要求する⁽³⁹⁾。しかし、好中性細菌である枯草菌のべん毛モーターの Na⁺駆動型固定子 MotPS は、外環境の pH が変化しても、Na⁺濃度に依存した運動性を示す⁽¹⁶⁾。このことは、好中性細菌である枯草菌と好アルカリ性細菌である *B. pseudofirmus* OF4 のべん毛モーターNa⁺駆動型固定子 MotPS では中性環境において Na⁺親和性が異なる可能性を示唆した。

好中性 *Bacillus* 属細菌の枯草菌と好アルカリ性 *Bacillus* 属細菌である *B. pseudofirmus* OF4 と *B. halodurans* C-125 に着目し、中性環境における Na⁺親和性に関与すると考えられるアミノ酸残基や領域の同定を試みた。その結果、MotP サブユニットの 3 番目の膜貫通領域内で好中性 *Bacillus* 属細菌と好アルカリ性 *Bacillus* 属細菌で保存性の異なるアミノ酸残基が同定された。好中性 *Bacillus* 属細菌ではリジン残基が、好アルカリ性 *Bacillus* 属細菌ではグルタミン残基が高度に保存されていた(図 4-2)。これらアミノ酸残基に対して構築した置換変異株の運動性試験の結果、好中性 *Bacillus* 属細菌のリジン残基と好アルカリ性 *Bacillus* 属細菌のグルタミン残基は、Na⁺親和性には関与していないことが示唆された(図 4-3、図 4-4)。

枯草菌の固定子欠損株に *B. pseudofirmus* OF4 由来の Na⁺駆動型固定子 MotPS を導入した株 OF4PS は pH 7.0 では NaCl を 200 mM 添加しても運動性を示さなかった。そこで、運動性復帰株を取得した。運動性復帰株からリボソーム結合サイト(RBS)の繰り返し挿入配列と MotP サブユニットの 186 番目のアスパラギン

がアスパラギン酸に置換された点変異(MotP-N186D)の2種類の変異を同定した。中性環境での運動性の復帰には MotP-N186D が関与していることが示唆された。MotP-N186 は、MotP サブユニットの 3 番目と 4 番目の膜貫通ヘリックス構造のペリプラズム側のループの 4 番目側の近傍に位置していると推定された。このことから、イオン流入ポアの入り口近傍のアスパラギン残基がマイナスの電荷を持つアスパラギン酸残基に置換されたことで、Na⁺がイオン流入ポアに入りやすくなり中性環境において運動性を回復したのではないかと推測した。

中性環境においても枯草菌は低 Na⁺濃度下で十分な運動性を示すが、OFPS 株は運動性を示さなかった(図 4-1)。なぜ、*B. pseudofirmus* OF4 由来の Na⁺駆動型固定子 MotPS は、中性環境、低 Na⁺濃度下では運動性を示さないのかを検証した。OFPS 株の低 Na⁺濃度下における運動性向上株は全てにおいて MotS サブユニットで変異が同定された。MotS サブユニットで同定した変異箇所は、膜貫通領域や Plug 領域⁽⁵⁰⁾、基部体に固定子が組み込まれるために大きく構造変化すると考えられている C 末端領域⁽⁴⁶⁾であった(図 4-5)。

サルモネラ菌の H⁺駆動型固定子 MotAB の MotB サブユニットの Plug 領域は、固定子の不活性化のために重要だと報告されている⁽⁵⁰⁾。すなわち、Plug 領域を欠損させた固定子を細胞内で発現させると共役イオン流入制御ができないため細胞内外のイオン濃度勾配を維持できないことから生育に影響する^(50,51)。また、*V. alginolyticus* の Na⁺駆動型固定子 PomB サブユニットの推定共役イオン結合部位 (D24)に変異が導入された(D24N)固定子はイオンチャネルとして機能できないので Plug 領域が欠損していてもイオンの過剰な流入が起こらない。そのため、野生株と同等の生育を示す⁽⁵¹⁾。これらのことから、Plug 領域は固定子の共役イオンの流入制御に重要であるといえる。低 Na⁺濃度下において取得された運動性向上株の変異導入箇所 5 箇所のうち 3 箇所が Plug 領域であった(図 5-3B)ことか

らも、Plug 領域が外環境の pH や共役イオン濃度を制御している可能性が示唆された。また、今回、低 Na⁺濃度下において取得された運動性向上株の運動性の向上は構造的な要因が考えられた。

今回得られた結果から、中性環境における *B. pseudofirmus* OF4 の運動性の低下の原因と考えられる Na⁺駆動型固定子 MotPS の Na⁺の流入制御にイオン流入ポア付近に存在するアミノ酸残基(N186)や Plug 領域が関与していることを推測することができた。また、これまで固定子の Plug 領域が外環境応答に関与していることを証明した報告はない。

今回の結果はべん毛モーター固定子の共役イオン流入制御機構を解明するための重要な情報であり、新たな知見が得られた。

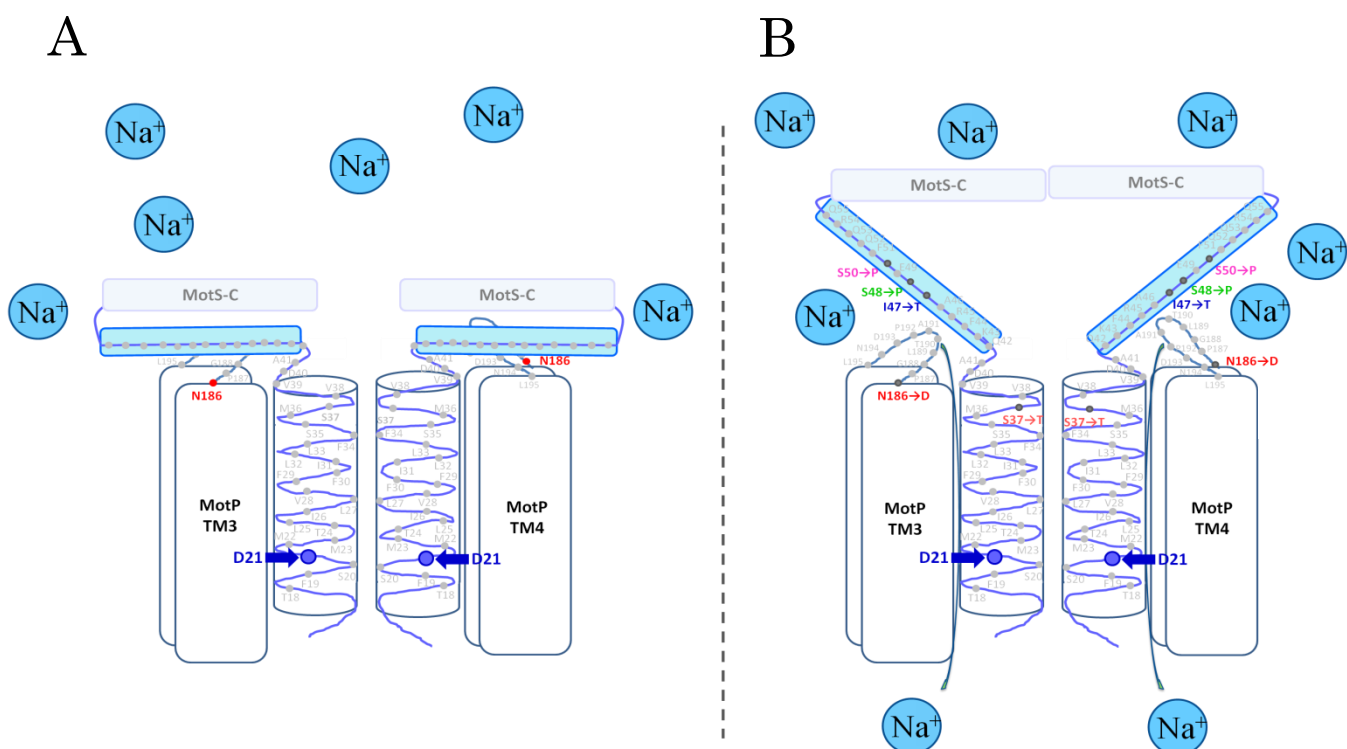


図 5-3. 好アルカリ性菌 *B. pseudofirmus* OF4 の Na^+ 駆動型固定子 MotPS の中性環境におけるイオン流入調節機構の概略図

A : 中性環境における好アルカリ性菌 *B. pseudofirmus* OF4 のチャンネルが閉じた状態の Na^+ 駆動型固定子 MotPS、B : 中性環境の低 Na^+ 濃度下から取得した運動性向上株のチャンネルが開いた状態の Na^+ 駆動型固定子 MotPS

好アルカリ性菌 *B. pseudofirmus* OF4 の Na^+ 駆動型固定子 MotPS の中性環境から取得した運動性復帰株から同定した変異箇所を赤字、中性環境で低 Na^+ 濃度下で取得された運動性向上株から同定した変異(MotS-S37、MotS-I47、MotS-S48、MotS-S50)は色を分けて示した。推定イオン結合部位を青色(o)で示した。水色の四角で囲った領域は Plug 領域を示す。

第4節 今後の展望

本研究では、好中性 *Bacillus* 属細菌である枯草菌が持つ H^+ 駆動型固定子 MotAB と Na^+ 駆動型固定子 MotPS と好アルカリ性菌 *B. pseudofirmus* OF4 の Na^+ 駆動型固定子 MotPS に着目し、べん毛モーターの回転機構の解明と固定子の共役イオンの流入制御機構の解明を試みた。

これまで 1 つのモーターに対して 2 種類の固定子が機能するハイブリッドモーターや Na^+ 駆動型固定子 MotPS の回転駆動力発生機構に関連する報告はなされていない。今回の結果から、枯草菌べん毛モーターの回転駆動力発生機構は、 H^+ 駆動型固定子 MotAB または Na^+ 駆動型固定子 MotPS と 1 つの回転子構成タンパク質 FliG 間における静電的相互作用に寄与するという知見を得ることができた。枯草菌べん毛では、モーターの回転に H^+ 駆動型固定子 MotAB はマイナス、 Na^+ 駆動型固定子 MotPS はプラスの電荷が重要であった。この結果は、枯草菌のべん毛モーターの回転子 FliG が 2 種類の固定子との相互作用を行う部位を使い分けている可能性を示唆している。

本研究は、べん毛モーターの固定子に着目して実験を行ったため、今後は回転子である FliG に着目して実験を行う必要がある。大腸菌における置換変異体解析や *Thermotoga maritima* における結晶構造解析の結果をもとに、枯草菌べん毛モーターの回転に重要だと考えられる回転子 FliG の C 末端領域の荷電アミノ酸残基候補(K264、R281、D288、D289、R296)を絞り込んだ^(26,27,28)。これらの FliG の荷電アミノ酸残基に着目して運動性解析や生理学的解析を行うことで回転駆動力発生機構が明らかになることが期待される。また、2 種類の固定子は外環境の Na^+ 濃度や pH に依存してモーターに取り込まれる比率を変化させている。大腸菌に *V. alginolyticus* の固定子 PomB サブユニットの N 末端領域と大腸菌の固

定子 MotB サブユニットの C 末端領域から作製されたキメラである Na⁺駆動型固定子 PomA/PotB と H⁺駆動型固定子 MotAB を発現させた株は、モーター内に取り込む固定子の比率を外環境の Na⁺濃度に依存して決定していることが報告されている⁽⁶²⁾。固定子のモーターへの取り込みは回転子と固定子間の静電的相互作用が関与していることから今後、外環境における固定子の選択機構を明らかにすることが期待される。

次に、今回、枯草菌の固定子における共役イオンの流入に関与または影響を与えると推定される多くのアミノ酸残基を同定した。固定子の立体構造が明らかとなれば、今回同定したアミノ酸残基の役割を更に詳しく明らかにできると期待される。

好アルカリ性 *Bacillus* 属細菌と好中性 *Bacillus* 属細菌では、中性環境における Na⁺親和性が異なることが示唆された。また、好アルカリ性 *Bacillus* 属細菌は中性環境において Na⁺の流入を抑制していることが示唆された。今回の研究では、固定子の共役イオンの流入調節機構に Plug 領域や固定子の構造が関与しているという知見を得ることが出来た。今後、本実験で取得した低 Na⁺濃度運動性向上株から更なる運動性向上株の取得や枯草菌と *B. pseudofirmus* OF4 の MotPS のキメラ変異体を構築し運動性解析を行うことにより、好中性 *Bacillus* 属細菌と好アルカリ性 *Bacillus* 属細菌の MotPS の中性環境における Na⁺親和性に関与するアミノ酸残基や領域を決定できることが期待される。

今後、固定子複合体の立体構造や機能に関与するアミノ酸残基や共役イオン透過の選択性が明らかになれば、人工的に選択した共役イオンを利用する固定子や生体ナノマシンの創成が期待される。

参考文献

- (1) 相沢慎一 (1998) バクテリアのべん毛モーター、PNE モノグラフ、共立出版
- (2) Berg, H. C. and Anderson, R. A. (1973) Bacteria swim by rotating their flagellar filaments. *Nature*, 245, 380–382.
- (3) Ordal, G. W., Marquez-Magana, L. M. and Chamberlin, M. J. (1993) Motility and chemotaxis. In *Bacillus subtilis* and other Gram-positive Bacteria : Biochemistry, Physiology, and Molecular Genetics (Sonenshein, A. L., Hock, J. A. & Losick, R., eds), *ASM Press*, Washington, DC.
- (4) 岡部真裕子、薬師寿治、本間道夫 (2002) 細菌べん毛. *日本細菌学* 57, 519–536
- (5) Macnab, R. M. (2003) How bacteria assemble flagella. *Annu. Rev. Microbiol.*, 57, 77–100.
- (6) Berg, H. C. (2003) The rotary motor of bacterial flagella. *Annu. Rev. Biochem.*, 72, 19–54.
- (7) Yamaguchi, S., Fujita, H., Ishihara, A., Aizawa, S. and Macnab, R.M. (1986) Subdivision of flagellar genes of *Salmonella typhimurium* into regions responsible for assembly, rotation, and switching. *J. Bacteriol.*, 166, 187–193.
- (8) Lloyd, S. A., Tang, H., Wang, X., Billings, S. and Blair, D. F. (1996) Torque generation in the flagellar motor of *Escherichia coli* : evidence of a direct role for FlhG but not FlhM or FlhN. *J. Bacteriol.*, 178, 223–231.
- (9) Kojima, S. and Blair, D. F. (2004) Solubilization and purification of the MotA/MotB complex of *Escherichia coli*. *Biochemistry*, 43, 26–34.
- (10) Zhou, J. Lloyd, S. A. and Blair, D. F. (1998) Electrostatic interactions between rotor and stator in the bacterial flagellar motor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 6436–6441.
- (11) Braun, T. F., Al-Mawsawi, L. Q., Kojima, S. and Blair, D. F. (2004) Arrangement of core membrane segments in the MotA/MotB proton-channel complex of *Escherichia coli*.

Biochemistry, 43, 35—45.

- (12) Blair, D. F., Kim, D. Y. and Berg, H. C. (1991) Mutant MotB proteins in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 173, 4049—4055.
- (13) Zhou, J., Sharp, L. L., Tang, H. L., Lloyd, S. A., Billings, S., Braun, T. F. and Blair, D. F. (1998) Function of protonatable residues in the flagellar motor of *Escherichia coli*: a critical role for Asp 32 of MotB. *J. Bacteriol.*, 180, 2729—2735.
- (14) Roujeinikova, A. (2008) Crystal structure of the cell wall anchor domain of MotB, a stator component of the bacterial flagellar motor: implications for peptidoglycan recognition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105, 10348—10353.
- (15) Hirota, N., Kitada, M. and Imae, Y. (1981) Flagellar motors of alkalophilic *Bacillus* are powered by an electrochemical potential gradient of Na⁺. *FEBS Lett.*, 132, 278—280.
- (16) Ito, M., Hicks, D. B., Henkin, T. M., Guffanti, A. A., Powers, B. D., Zvi, L., Uematsu, K. and Krulwich, T. A. (2004) MotPS is the stator-force generator for motility of alkaliphilic *Bacillus* and its homologue is a second functional Mot in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.*, 53, 1035—1049.
- (17) Terahara, N., Krulwich, T. A. and Ito, M. (2008) Mutations alter the sodium versus proton use of a *Bacillus clausii* flagellar motor and confer dual ion use on *Bacillus subtilis* motors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 38, 14359-14364.
- (18) Terahara, N., Sano, M. and Ito, M. (2012) A *Bacillus* flagellar motor that can use both Na⁺ and K⁺ as a coupling ion is converted by a single mutation to use only Na⁺. *PLOS ONE*, 7, e46248.
- (19) Asai, Y., Kojima, S., Kato, H., Nishioka, N., Kawagishi, I. and Homma, M. (1997) Putative channel components for the fast-rotating sodium-driven flagellar motor a marine bacterium. *J. Bacteriol.*, 179, 5104-5110.

- (20) Yorimitsu, T. and Homma, M. (2001) Na⁺ driven flagellar motor of *Vibrio*. *Biochim. Biophys. Acta*, 1505, 82-93.
- (21) Asai, Y., Kawagishi, I., Sockett, R. E. and Homma, M. (1999) Hybrid motor with H⁺ and Na⁺ driven components can rotate *Vibrio* polar flagella by using sodium ions. *J. Bacteriol.*, 181, 6332-6338.
- (22) Terahara, N., Fujisawa, M., Powers, B., Henkin, T. M., Krulwich, T. A. and Ito, M. (2006) An intergenic stem-loop mutation in the *Bacillus subtilis* *ccpA-motPS* operon increases *motPS* transcription and the MotPS contribution to motility. *J. Bacteriol.*, 188, 2701-2705.
- (23) Anja, P., Andrea, K., Jurgen, L., Stuart, H., Ina, W., Franz, N. and Kai, M. T. (2009) Two different stator systems drive a single polar flagellum in *Shewanella oneidensis* MR-1. *Mol. Microbiol.*, 71, 836-850.
- (24) Nicolas, D. and Judith, P. A. (2009) Parts exchange: tuning the flagellar motor to fit the conditions. *Mol. Microbiol.*, 71, 807-810.
- (25) Ito, M., Terahara, N., Fujinami, S. and Krulwich, T.A. (2005) Properties of motility in *Bacillus subtilis* powered by the H⁺-coupled MotAB flagellar stator, Na⁺-coupled MotPS or hybrid stators MotAS or MotPB. *J. Mol. Biol.*, 352, 396-408.
- (26) Lloyd, S. A., Whitby, F. G., Blair, D. F. and Hill, C. P. (1999) Structure of the C-terminal domain of FliG, a component of the rotor in the bacterial flagellar motor. *Nature*, 400, 472-475.
- (27) Brown, P. N., Hill, C. P. and Blair, D. F. (2002) Crystal structure of the middle and C-terminal domains of the flagellar rotor protein FliG. *EMBO J.*, 21, 3225-3234.
- (28) Lloyd, S. A. and Blair, D. F. (1997) Charged residues of the rotor protein FliG essential for torque generation in the flagellar motor of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.*, 235, 1261-1270.
- (29) Zhou, J. and Blair, D. F. (1997) Residues of the cytoplasmic domain of MotA essential for

- torque generation in the bacterial flagellar motor. *J. Mol. Biol.*, 273, 428-439.
- (30) Morimoto, Y. V., Nakamura, S., Kami-ike, N., Namba, K. and Minamino, T. (2010)
Charged residues in the cytoplasmic loop of MotA are required for stator assembly into the bacterial flagellar motor. *Mol. Microbiol.*, 78, 1117-1129.
- (31) Morimoto, Y. V., Nakamura, S., Hiraoka, K. D., Namba, K. and Minamino, T. (2013)
Distinct roles of highly conserved charged residues at the MotA-FliG interface in bacterial flagellar motor rotation. *J. Bacteriol.*, 195, 474-481.
- (32) Yorimitsu, T., Sowa, Y., Ishijima, A., Yakushi, T. and Homma, M. (2002) The systematic substitutions around the conserved charged residues of the cytoplasmic loop of Na⁺-driven flagellar motor component PomA. *J. Mol. Biol.*, 320, 403-413.
- (33) Fukuoka, H., Yakushi, T. and Homma, M. (2004) Concerted effects of amino acid substitutions in conserved charged residues and other residues in the cytoplasmic domain of PomA , a stator component of Na⁺-driven flagella. *J. Bacteriol.*, 186, 6749-6758.
- (34) Yorimitsu, T., Mimaki, A., Yakushi, T. and Homma, M. (2003) The conserved charged residues of the C-terminal region of FliG, a rotor component of the Na⁺-driven flagellar motor. *J. Mol. Biol.*, 334, 567-583.
- (35) Takekawa, N., Kojima, S. and Homma, M. (2014) Contribution of many charged residues at the stator-rotor interface of the Na⁺-driven flagellar motor to torque generation in *Vibrio alginolyticus*. *J. Bacteriol.*, 196, 1377-1385.
- (36) Fujinami, S., Terahara, N., Lee, S. and Ito, M. (2007) Na⁺ and flagella dependent swimming of alkaliphilic *Bacillus pseudofirmus* OF4: a basis for poor motility at low pH and enhancement in viscous media in an “up-motile” variant. *Arch. Microbiol.*, 187, 239-247.
- (37) Grundy, F. J., Takova, D. A., T. Y. and Henkin, T. M. (1993) Identification of genes

- involved in utilization of acetate and acetoin in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.*, 10, 259-271.
- (38)寺原直矢、枯草菌におけるべん毛固定子の構造と機能に関する研究、東洋大学大学院、平成17年度、修士論文
- (39) Grundy, F. J. and Henkin, T. M. (1991) The *rpsD* gene, encoding ribosomal protein S4, is autogenously regulated in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, 173, 4595-4602.
- (40) Ireton, K., Rudner, D. Z., Siranosian, K. J. and Grossman, A. D. (1993) Integration of multiple developmental signals in *Bacillus subtilis* through the Spo0A transcription factor. *Gene*, 7, 283-291.
- (41) 松村正寛、ラボマニュアル遺伝子工学 増補版、丸善株式会社
- (42) Spizizen, J. (1958) Transformation of biochemically deficient strains of *Bacillus subtilis* by deoxyribonucleate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 44, 1072-1078.
- (43) Cheng, J., Guffanti, A. A., and Krulwich, T. A. (1994) The chromosomal tetracycline resistance locus of *Bacillus subtilis* encodes a Na⁺/H⁺ antiporter that is physiologically important at elevated pH. *J. Biol. Chem.*, 269, 27365-27371.
- (44)古山琴美、枯草菌べん毛モーター固定子におけるイオン流入経路に関与するアミノ酸残基の同定、東洋大学大学院、平成24年度、修士論文
- (45) O'Neill, J. and Roujeinikova, A. (2008) Cloning, purification and crystallization of MotB, a stator component of the proton-driven bacterial flagellar motor. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.*, 64, 561-563.
- (46) Kojima, S., Imada, K., Sakuma, M., Sudo, Y., Kojima, C., Minamino, T., Homma, M. and Namba, K. (2009) Stator assembly and activation mechanism of the flagellar motor by the periplasmic region of MotB. *Mol Microbiol.*, 73, 710-718.
- (47) O'Neill, J., Xie, M., Hijnen, M. and Roujeinikova, A. (2011) Role of the MotB linker in the

- assembly and activation of the bacterial flagellar motor. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.*, 67, 1009-1016.
- (48) Aono, R., Ogino, H. and Horicoshi, K. (1992) pH dependent flagella formation by facultative alkaliphilic *Bacillus* sp. C-125. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 56, 48-53.
- (49) 野口有希奈、好アルカリ性細菌 *Bacillus pseudofirmus* OF4株の中性環境での運動性低下に關与するべん毛モーター固定子中のアミノ酸残基の同定、東洋大学大学院、平成24年度、修士論文
- (50) Hosking, E. R., Vogt, C., Bakker, E. P. and Manson, M. D. (2006) The *Escherichia coli* MotAB proton channel unplugged. *J. Mol. Biol.*, 364, 921-937.
- (51) Takekawa, N., Li, N., Kojima, S. and Homma, M. (2012) Characterization of PomA mutants defective in the functional assembly of the Na⁺-driven flagellar motor in *Vibrio alginolyticus*. *J. Bacterio.*, 194, 1934-1942.
- (52) 長谷川武治 編著、改訂版 微生物の分類と同定 <下>、株式会社 学生出版センター、112—133.
- (53) 福岡創、薬師寿治、本間道夫 (2005)イオン駆動型べん毛の回転機構：回転力はどこで発生しているのだろうか？ 生物物理, 45, 22-27.
- (54) Fujinami, S., Terahara, N., Krulwich, T.A. and Ito, M. (2009) Motility and chemotaxis in alkaliphilic *Bacillus* species. *Future Microbiol.*, 4, 1137-1149.
- (55) Matsuura, S., Shioi, J. and Imae, Y. (1977) Motility in *Bacillus subtilis* driven by an artificial proton motive force. *FEBS Lett.*, 82, 187-190.
- (56) Block, S. M. and Berg, H. C. (1984) Successive incorporation of force-generating units in the bacterial rotary motor. *Nature*, 309, 470-472.
- (57) Kojima, S. and Blair, D. F. (2004) The bacterial flagellar motor: structure and function of complex molecular machine. *Int. Rev. Cytol.*, 233, 93-134.

- (58) Blair, D. F. and Berg, H. C. (1990) The MotA protein of *E. coli* is a proton-conducting component of the flagellar motor. *Cell*, 60, 439-449.
- (59) Blair, D. F. (1995) How bacteria sense and swim. *Annu. Rev. Microbiol.*, 49, 489-522.
- (60) Larsen, S. H., Adler, J., Gargus, J. J. and Hogg, R. W. (1974) Chemomechanical coupling without ATP: the source of energy for motility and chemotaxis in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 71, 1239-1243.
- (61) Khan, S. (1995) Gene to ultra structure : the case of the flagellar basal body. *J. Bacteriol.*, 175, 2169-2174.
- (62) Sowa, Y., Homma, M., Ishijima, A. and Berry, M. R. (2014) Hybrid-fuel bacterial flagellar motors in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 111, 3436-3441.

本研究における成果

学術論文(主論文)

1. Takahashi, Y. and Ito, M. (2014) Mutational analysis of charged residues in the cytoplasmic loops of MotA and MotP in the *Bacillus subtilis* flagellar motor. *J. Biochemistry*, PMID: 24771657. *In press*
2. Takahashi, Y., Koyama, K. and Ito, M. (2014) Suppressor mutants from MotB-D24E and MotS-D30E in the flagellar stator complex of *Bacillus subtilis*. *J. General and Applied Microbiology*. *In press*

受賞一覧

1. 2009 年度 第 10 回 極限環境微生物学会年会 ポスター賞
2. 2012 年度 日本農芸化学会関東支部・若手奨励賞(ポスター部門)

学会発表

1. 高橋優嘉、寺原直矢、小泉幸代、伊藤政博 (ポスター発表)
「枯草菌べん毛モーターの回転機構に重要な荷電アミノ酸残基の同定と解析」
第 9 回極限環境微生物学会年会、東京、2008 年 11 月
2. Yuka Takahashi, Naoya Terahara, Yukiyo Koizumi, Masahiro Ito (Poster)
「A role for the conserved charged residues in two flagellar stators of *Bacillus subtilis*」
6th International Symposium on Bioscience and Nanotechnology, Tokyo, Japan, November 2008

3. 高橋優嘉、寺原直矢、小泉幸代、伊藤政博 (ポスター発表)

「枯草菌が持つ 2 種類のべん毛モーター固定子における回転機構に重要なアミノ酸残基の同定と解析」

第 31 回日本分子生物学会年会第 81 回日本生化学会大会合同大会、神戸、2008 年 12 月

4. 高橋優嘉、寺原直矢、小泉幸代、伊藤政博 (ポスター発表)

「枯草菌べん毛モーター固定子 MotAB、MotPS のトルク産出における重要なアミノ酸残基の同定と解析」

日本農芸化学会 2009 年大会、福岡、2009 年 3 月

5. 高橋優嘉、寺原直矢、小泉幸代、伊藤政博 (ポスター発表)

「枯草菌が持つ 2 種類のべん毛モーター固定子 MotAB、MotPS の回転機構に重要なアミノ酸残基の同定と解析」

第 10 回極限環境微生物学会年会、東京、2009 年 10 月

6. 高橋優嘉、寺原直矢、小泉幸代、伊藤政博 (ポスター発表)

「Analysis of the conserved charged residues in flagellar stator proteins MotA and MotP of *Bacillus subtilis*」

第 47 回日本生物物理学会年会、徳島、2009 年 10 月

7. Yuka Takahashi, Naoya Terahara, Yukiyo Koizumi, Masahiro Ito (Poster)

「A role for the conserved charged residues in flagellar stators proteins MotA and MotP of *Bacillus subtilis*」

7th International Symposium on Bioscience and Nanotechnology, Tokyo, Japan, November 2009

8. **Yuka Takahashi**, Naoya Terahara, Yukiyo Koizumi, Masahiro Ito (Poster)

「Analysis of the conserved charged residues in flagellar stator proteins MotA and MotP of *Bacillus subtilis*」

Gordon Research Conferences Sensory Transduction In Micro organisms, Ventura, USA,
January 2010

9. **高橋優嘉**、伊藤政博 (ポスター発表)

「枯草菌べん毛モーターの回転機構に重要な荷電アミノ酸残基」

日本農芸化学会 2010 年度関東支部大会、千葉、2010 年 10 月

10. **高橋優嘉**、伊藤政博 (口頭発表)

「枯草菌べん毛モーターの回転機構における固定子 MotAB、MotPS の重要な荷電アミノ酸残基」

第 11 回極限環境生物学会年会、京都、2010 年 11 月

11. **Yuka Takahashi**, Naoya Terahara, Yukiyo Koizumi, Masahiro Ito (Poster)

「Analysis of the charged residues in flagellar stator two proteins of *Bacillus subtilis*」

8th International Symposium on Bioscience and Nanotechnolgy, Tokyo, Japan, December 2010

12. **Yuka Takahashi**, Masahiro Ito (Poster)

「The functional role of the conserved cytoplasmic charged amino acid residues in two different flagellar stators of *Bacillus subtilis*」

6th International Conference on Gram-Positive Microorganisms. 16th International Conference on Bacilli, Montecatini Terme, Italy, June 2011

13. **Yuka Takahashi**, Masahiro Ito (Poster)

「A role of the conserved charged residues in flagellar stator proteins MotA and MotP of *Bacillus subtilis*」

第 84 回日本細菌学会総会、札幌、2011 年 9 月

14. 高橋優嘉、伊藤政博 (ポスター発表)

「枯草菌が持つ 2 種類のイオンを駆動力として用いるべん毛モーター固定子の回転駆動力発生に重要な荷電アミノ酸残基」

日本農芸化学会 2011 年度関東支部大会、群馬、2011 年 10 月

15. 高橋優嘉、伊藤政博 (ポスター発表)

「枯草菌が持つべん毛モーターの運動性において重要な 2 種類の固定子の荷電アミノ酸残基の特定」

第 12 回極限環境生物学会年会、長崎、2011 年 11 月

16. Yuka Takahashi, Masahiro Ito (Poster)

「A role of charged amino acid residues in flagellar stator two proteins MotAB and MotPS of *Bacillus subtilis*」

9th International Symposium on Bioscience and Nanotechnology, Kawagoe, Japan, December 2011

17. 高橋優嘉、伊藤政博 (口頭発表)

「枯草菌べん毛モーターの固定子における荷電アミノ酸の役割」

日本農芸化学会 2012 年大会、京都、2012 年 3 月

18. Yuka Takahashi, Masahiro Ito (Poster)

「The charged amino acid residues of two different stators of the flagellar motor in *Bacillus subtilis* are important for motility」

17th European Bioenergetics Conference, Freiburg, Germany, September 2012

19. 高橋優嘉、伊藤政博 (ポスター発表)

「The functional role of the cytoplasmic charged amino acid residues of two different stators MoA subunit and MotP subunit in *Bacillus subtilis* flagellar motor」

第 50 回日本生物物理学会年会、名古屋、2012 年 9 月

20. 高橋優嘉、伊藤政博 (ポスター発表)

「2 種類の共役イオンが利用できるハイブリット型生物モーターの回転機構の解明」

日本農芸化学会 2012 年度関東支部大会、新潟、2012 年 10 月

21. 高橋優嘉、野口有希奈、伊藤政博(ポスター発表)

「好アルカリ性細菌 *Bacillus pseudofirmus* OF4 株の Na⁺駆動型べん毛モーター固定子 MotPS における中性環境でのイオン透過性に重要なアミノ酸残基」

第 13 回極限環境生物学会年会、東京、2012 年 12 月

22. Yuka Takahashi, Masahiro Ito (Poster)

「Rotation mechanism using two types of ions in a hybrid motor in *Bacillus subtilis*」

10th International Symposium on Bioscience and Nanotechnology, Tokyo, Japan, December 2012

23. 高橋優嘉、野口有希奈、伊藤政博(口頭発表)

「中性環境における好アルカリ性細菌 *Bacillus pseudofirmus* OF4 株が持つ Na⁺駆動型べん毛モーター固定子 MotPS のイオン透過を高めるアミノ酸残基の同定」

日本農芸化学会 2013 年大会、仙台、2013 年 3 月

24. 高橋優嘉、野口有希奈、伊藤政博(ポスター発表)

「好アルカリ性 *Bacillus* 属細菌べん毛モーターの中性環境での遊泳低下に関与する固定子内のアミノ酸残基の探索」

第 1 回新学術領域研究「運動超分子マシナリーが織りなす調和と多様性」班会議、名古屋、2013 年 6 月

25. 高橋優嘉、野口有希奈、伊藤政博(ポスター発表)

「好アルカリ性細菌由来の Na⁺駆動型べん毛モーター固定子 MotPS の中性環境における Na⁺の流入抑制機構の解明」

第 14 回極限環境生物学会年会、生田、2013 年 10 月

26. 高橋優嘉、野口有希奈、伊藤政博(ポスター発表)

「中性環境における好アルカリ性細菌 *Bacillus pseudofirmus* OF4 株が持つ Na⁺駆動型
べん毛モーター固定子 MotPS のイオン透過を高めるアミノ酸残基の同定」

第 51 回日本生物物理学会年会、京都、2013 年 10 月

27. Yuka Takahashi, Yukina Noguchi, Masahiro Ito (Poster)

「Critical amino acid residues for the regulation of Na⁺ influx at neutral pH of the Na⁺-driven
flagellar motor stator MotPS in alkaliphilic *Bacillus*」

11th International Symposium on Bioscience and Nanotechnology, Tokyo, Japan, November 2013

28. 高橋優嘉、野口有希奈、伊藤政博(口頭発表)

「中性環境における好アルカリ性細菌と好中性細菌の Na⁺駆動型べん毛モーター固定
子 MotPS のイオン流入制御機構の解析」

日本農芸化学会 2014 年大会、生田、2014 年 3 月

29. 高橋優嘉、野口有希奈、伊藤政博(ポスター発表)

「好アルカリ性 *Bacillus* 属細菌の Na⁺駆動型べん毛モーター固定子 MotPS の中性環境
における Na⁺透過機構の解析」

第 2 回新学術領域研究「運動超分子マシナリーが織りなす調和と多様性」班会議、旭
川、2013 年 6 月

30. Yuka Takahashi, Yukina Noguchi, Masahiro Ito (Poster)

「The clarification of the differences between alkaliphilic and neutralophilic *Bacillus* influx
control of Na⁺ near neutral pH in the Na⁺-driven flagellar motor stator MotPS」

10th International Congress on Extremophiles, Saint Petersburg, Russia, September 2014.

謝辞

本研究を行うに当たり多岐にわたる御懇切な御指導と御協力を賜りました、東洋大学大学院生命科学研究科、伊藤政博教授に心から御礼申し上げます。本研究に携わる機会や研究発表の場を与えてくださったことを大変嬉しく思い、現在の成果に至るまで多大なご支援と御協力を賜りましたことを重ねて御礼申し上げます。

極限環境微生物ワーキンググループミーティングを通じて、御指導と御協力を頂きました、東洋大学大学院学際・融合科学研究科、井上明特任教授、東洋大学大学院生命科学研究科、道久則之教授、鳴海一成教授、高品知典准教授、東端啓貴准教授、三浦健准教授に御礼申し上げます。

また、様々な御指導や御支援を頂きました寺原直矢先輩、守野正人先輩に御礼申し上げます。実験室において、より良い研究環境を作って頂いた伊藤研究室に所属する皆様、楽しい学生生活を共に過ごした友人達に深く感謝します。

そして、家族には博士課程に進学するという私の意思を尊重し、多大なる応援と御支援を頂きましたことを心より感謝します。

最後ではありますが、素晴らしい研究課題と研究環境、御指導を賜りました伊藤政博教授をはじめとする多くの方々の御支援により学生生活を過ごせたことを大変嬉しく思い、心から感謝すると共に、今後の伊藤研究室の更なる発展をお祈り申し上げます。

2014 年 8 月 21 日

高橋優嘉